

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Patología Animal I
(Sanidad Animal)



RECUPERACIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES
DAÑADA SUBLETALMENTE POR EFECTO DE LA
CONGELACIÓN

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Mar Blanco Gutiérrez

Bajo la dirección de los doctores

José Francisco Fernández Garayzabal,
Lucas Domínguez Rodríguez

Madrid, 2002

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL I

**RECUPERACION DE *Listeria monocytogenes* DAÑADA
SUBLETALMENTE POR EFECTO DE LA CONGELACION**

M^a del Mar Blanco Gutiérrez

Memoria presentada para optar al

Título de Doctor en Veterinaria

Madrid, 1994

INDICE

I. INTRODUCCION

I.A. El género <i>Listeria</i>	1
I.A.1. Taxonomía	1
I.A.2. Características generales de <i>Listeria</i> spp.	3
I.A.3 Patogenicidad en el género <i>Listeria</i>	4
I.B. La listeriosis como enfermedad de origen alimentario	4
I.B.1 Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en los alimentos	8
I.B.1.a. Leche y productos lácteos	8
I.B.1.b. Carne y productos cármicos	10
I.B.1.c. Otros alimentos	12
I.B.2. Origen de la contaminación de los alimentos por <i>L. monocytogenes</i>	12
I.B.3. Control de la presencia y crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en los alimentos	14
I.B.3.a. Tratamientos aplicados para la destrucción de <i>L. monocytogenes</i>	14
I.B.3.b. Tratamientos aplicados para controlar el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	15
I.B.4. Destino de los alimentos contaminados. Criterio de los organismos oficiales	17
I.C. Efectos de la congelación de los alimentos sobre <i>L. monocytogenes</i>	18
I.C.1. Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> a la congelación	20
I.C.2. Factores que influyen en la sensibilidad de <i>L. monocytogenes</i> a la congelación	22
I.C.3. Reparación de <i>L. monocytogenes</i> dañada subletalmente	24
I.C.4. Implicación en Microbiología de los Alimentos	25
I.D. Métodos de detección de <i>Listeria</i> y <i>L. monocytogenes</i> en los alimentos	26
I.D.1. Métodos inmunológicos y moleculares	27
I.D.1.a. Técnicas inmunológicas	27
I.D.1.b. Técnicas moleculares	28
I.D.2. Métodos microbiológicos clásicos	30
I.D.2.a. Técnicas de enriquecimiento	31
I.D.2.a.1. Enriquecimiento en frío	31
I.D.2.a.2. Enriquecimiento selectivo	32
I.D.2.a.3. Medios diferenciales	35
I.D.2.b. Métodos de aislamiento	35
I.D.2.b.1. Medios selectivos	36
I.D.2.b.2. Diferenciación de las colonias de <i>Listeria</i> . Técnica de Henry	39
I.D.2.b.3. Medios selectivos diferenciales	39
I.D.2.c. Diferenciación de las especies de <i>Listeria</i> por su capacidad hemolítica	41
I.D.2.d. Técnicas de enumeración	43
I.D.2.e. Detección de <i>L. monocytogenes</i> dañada subletalmente por congelación	44

II. OBJETIVOS	46
III.MATERIAL Y METODOS	
III.A. Cepas de <i>Listeria</i>	48
III.A.1. Preparación de las suspensiones de <i>Listeria</i>	48
III.B. Determinación de las condiciones optimas de congelación/ descongelación de una suspensión de listerias	49
III.B.1. Determinación del tiempo de almacenamiento en congelación y número de descongelaciones	50
III.B.2. Determinación de la concentración óptima de listerias en la suspensión congelada	50
III.B.3. Determinación del porcentaje de listerias dañadas subletalmente tras un tratamiento de congelación/descongelación	52
III.C. Eficacia de distintos medios selectivos para el aislamiento directo de <i>Listeria</i> tras su congelación	52
III.D. Reparación de listerias dañadas subletalmente por congelación en BHI	53
III.E. Influencia del cloruro de litio (CL) en la reparación y el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> tras su congelación	54
III.E.1. Efecto del CL sobre el crecimiento de la microlora presente habitualmente en los alimentos	54
III.E.1.a. Preparación del homogeneizado de alimentos (HA)	54
III.E.1.b. Influencia del CL sobre el crecimiento de los microorganismos del homogeneizado de alimentos en BHI	55
III.E.2. Influencia del momento de la incorporación del CL sobre la reparación de <i>L. monocytogenes</i> dañada subletalmente por congelación	57
III.F. Influencia de distintas condiciones de incubación sobre la recuperación de <i>L. monocytogenes</i> dañada por congelación	57
III.F.1. Influencia de la incubación con y sin agitación	58
III.F.2. Influencia de la temperatura de incubación	58
III.F.3. Influencia de la disponibilidad de oxígeno	59
III.G. Límite de detección de <i>L. monocytogenes</i> dañada por congelación en BHI-CL en presencia de otros microorganismos	59
III.H. Eficacia de distintos medios de enriquecimiento selectivos para la recuperación de listerias congeladas en presencia de otros microorganismos	59

III.H.1. Inoculación experimental	60
III.H.2. Productos comerciales congelados	60
III.H.2.a. Alimentos empleados	60
III.H.2.b. Procesado de los alimentos congelados	61
III.H.2.c. Recuperación de las listerias presentes en las muestras	61
III.H.2.d. Determinación de la hemólisis de las colonias de <i>Listeria</i> y su identificación ...	62

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.A. Influencia de las condiciones de congelación/descongelación de una suspensión de listerias sobre la muerte y el daño celular	64
IV.A.1. Influencia del tiempo en congelación	64
IV.A.2. Efecto del número de ciclos de congelación/descongelación aplicados	66
IV.A.3. Concentración de listerias	67
IV.B. Eficacia de distintos medios selectivos para el aislamiento directo de <i>Listeria</i> tras su congelación	71
IV.C. Reparación de listerias dañadas subletalmente por congelación en BHI	72
IV.D. Influencia del cloruro de litio (CL) en la reparación y el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> dañada por congelación	77
IV.D.1. Efecto del CL sobre el crecimiento de la microflora presente habitualmente en los alimentos	77
IV.D.2. Influencia del momento de la incorporación del CL sobre la reparación de <i>L. monocytogenes</i> dañada subletalmente por congelación	82
IV.E. Influencia de distintas condiciones de incubación sobre la recuperación de <i>L. monocytogenes</i> dañada por congelación	85
IV.E.1. Influencia de la incubación con y sin agitación	86
IV.E.2. Influencia de la temperatura de incubación	89
IV.E.3. Influencia de la disponibilidad de oxígeno	92
IV.F. Límite de detección de <i>L. monocytogenes</i> dañada por congelación en BHI-CL en presencia de otros microorganismos	94
IV.G. Eficacia de distintos medios de enriquecimiento selectivos para la recuperación de listerias dañadas subletalmente por congelación en presencia de otros microorganismos	95

CONCLUSIONES	102
--------------------	-----

BIBLIOGRAFIA	103
--------------------	-----

INTRODUCCION

I.A. EL GENERO *Listeria*

I.A.1. Taxonomía

El género *Listeria* está constituido por bacilos gram positivos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, no miceliares, catalasa positivos, y productores de ácido L (+) láctico en el metabolismo fermentativo de la glucosa.

La clasificación del género *Listeria* ha sufrido numerosas variaciones a lo largo de más de treinta años. Así, en las sucesivas ediciones del *Manual de Bergey*, se le ha situado en diferentes secciones y asociado a diferentes familias y géneros. En la séptima edición de 1957 apareció incluido dentro de la familia *Corynebacteriaceae* (Breed y col., 1957). Sin embargo, estudios posteriores de taxonomía numérica y estudios quimiotaxonómicos evidenciaron su incorrecta clasificación. La posición de *Listeria* entre los microorganismos gram positivos, según queda determinada por el análisis de taxonomía numérica, se ve reafirmada por las propiedades quimiotaxonómicas de esta subdivisión: bajo contenido en Guanina+Citosina (36-42%), carencia de ácidos micólicos, y presencia de ácidos lipoteicoicos. Además, la transferencia de material genético entre *Listeria* y *Bacillus* y *Streptococcus*, así como las reacciones antigénicas cruzadas con *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Lactobacillus*, evidencian la adecuada situación taxonómica del género *Listeria*. (Seeliger y col., 1969). De esta forma, en la siguiente edición del Manual de Bergey de 1974 aparece incluido en la sección 16 como género de afiliación incierta, relacionándose con la familia *Lactobacillaceae* y el género *Erysipelothrix* entre otros (Seeliger y Welshimer, 1974). A partir de entonces, gracias a los estudios del material genético (hibridación ADN-ADN, análisis del ARNr 16S) se comprobó la escasa relación filogenética del género *Listeria* con el grupo de bacterias corineformes, y su cercanía a los géneros *Brochothrix* y *Lactobacillus* (Collins y col., 1991). Como consecuencia, en la última edición de 1986, el género *Listeria* aparece situado en la sección 14 del Manual como bacilos gram positivos regulares no esporulados, junto con los géneros antes mencionados, entre otros (Seeliger y Jones, 1986).

En cuanto a la clasificación de las especies dentro del género, *L. monocytogenes* fue la única especie reconocida del género *Listeria* hasta 1961 (Fiedler y Seger, 1983). *L. denitrificans*, *L. grayi* y *L. murrayi* fueron incluidas en el género en 1961, 1966 y 1971

respectivamente (Larsen y Seeliger, 1986; Prevot, 1961; Welshimer y Meredith, 1971). En 1977, Seeliger propuso una nueva especie para el género: *L. innocua* (Seeliger, 1981), que difiere de *L. monocytogenes* en que carece de la capacidad hemolítica y del poder patógeno. En 1984, Seeliger y col. describieron otra de las especies de *Listeria*: *L. ivanovii* (previamente denominada *L. bulgarica*), que se definió a partir de cepas del serovar 5 de *L. monocytogenes*, caracterizadas por producir un marcado efecto hemolítico bizonal en agar sangre. Poco después se describieron dos nuevas especies a partir de cepas de *L. monocytogenes*; éstas fueron denominadas como *L. welshimeri* y *L. seeligeri*, poseyendo ésta última la característica de ser ligeramente hemolítica en agar sangre (Rocourt y col., 1987a).

En la última edición del Manual de Bergey se enumeran ocho especies incluídas en el género *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. murrayi*, *L. grayi*, y *L. denitrificans* (Seeliger y Jones, 1986). Sin embargo, esta clasificación intragenérica no duró mucho, debido a estudios taxonómicos que realizaron Rocourt y col. (1987b), en los que comprobaron que *L. denitrificans* no debía estar incluída en el género *Listeria*. Análisis del ARNr 16S localizaron a esta especie dentro del grupo de los actinomicetos (bacterias gram positivas con alto contenido en Guanina+Citosina). El bajo grado de relación genómica de esta bacteria con cualquier otro género descrito, junto con un perfil original de propiedades quimiotaxonómicas, justificaron la creación de un nuevo género: el género *Jonesia*, que incluye una sola especie, *J. denitrificans* (Rocourt y col., 1987b).

En 1974, Stuart y Welshimer propusieron la separación de *L. grayi* y *L. murrayi* del género *Listeria* debido a la diferencia entre éstas y el resto de las especies del género. Sin embargo, estudios de taxonomía numérica revelaron un porcentaje de similitud del 81 al 87% entre estos dos grupos, lo cual indicó que tanto *L. grayi* como *L. murrayi* pertenecían al género *Listeria* (Rocourt y col., 1987c). Más recientemente, y debido a la similitud encontrada entre *L. grayi* y *L. murrayi*, estas dos especies han sido consideradas para su reclasificación, quedando ambas especies fusionadas en una: *L. grayi*, que fue la primera en describirse (Rocourt y col., 1992).

Por último, en el mismo año, los estudios de Boerlin y col. (1991) sobre cepas de *L. ivanovii* han llevado a la inclusión dentro de esta especie de una subespecie: *L. ivanovii*.

subespecie *londoniensis*.

Actualmente, y tras todas estas modificaciones que se han venido realizando en los últimos años, podemos decir que el género *Listeria* se halla constituido por seis especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* y *L. ivanovii* con sus dos subespecies *londoniensis* e *ivanovii* (Jones, 1992).

I.A.2. Características generales de *Listeria* spp.

Morfológicamente, las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos cortos y regulares, de 0,4 a 0,5 μm de ancho por 0,5 a 2,0 μm de largo; pueden disponerse individualmente o en cadenas cortas, presentando a menudo formas en "V", aunque en cultivos envejecidos pueden aparecer en filamentos de 6 a 20 μm de longitud. Son gram-positivos, aunque en cultivos viejos pueden perder su capacidad para retener los colorantes. No presentan cápsula ni forman esporos.

Fisiológicamente, las listerias son microorganismos aerobios y facultativamente anaerobios. Son móviles por flagelos peritricos que se expresan mejor a 20-25°C que a temperaturas más elevadas. Pueden crecer en un amplio intervalo de pH y temperatura e, igualmente, son bastante resistentes a las agresiones físico-químicas, lo que les confiere una gran posibilidad de supervivencia y multiplicación en el medio ambiente. Así, pueden multiplicarse a pH entre 5 y 9, y a temperaturas que oscilan entre 0 y 45°C (aunque la temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C), considerándosele un microorganismo capaz de sobrevivir en el medio ambiente durante prolongados periodos de tiempo (más de 15 años) siempre que se encuentren en presencia de materia orgánica y que las condiciones de pH, temperatura, actividad de agua, etc. no le sean adversas. Todas las especies del género son catalasa y esculina positivo, características muy importantes para su diferenciación de otros géneros, y que se han empleado en la formulación de medios de cultivo selectivos y diferenciales, como veremos en el apartado I.D. (Domínguez y col., 1984; Blanco y col., 1989; Van Netten y col., 1989; Curtis y col., 1989).

I.A.3. Patogenicidad en el género *Listeria*

De las seis especies que componen actualmente el género *Listeria*, únicamente dos, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* se consideran patógenas de forma natural, ya que aunque *L. seeligeri* ha sido asociada con un caso de meningitis (Rocourt y col., 1986), se la considera no patógena.

La infección humana por *L. ivanovii* ha sido descrita sólo en contadas ocasiones (Seeliger, 1984), afectando a los animales domésticos (principalmente ovino), donde la enfermedad se manifiesta fundamentalmente por cuadros clínicos de abortos y septicemias neonatales.

La principal especie patógena del género es *L. monocytogenes*, responsable de la mayor parte de los casos de listeriosis humana y animal. Los cuadros clínicos que produce son muy variados, así como las especies susceptibles de padecer la enfermedad. La listeriosis en el hombre se manifiesta de muy diversas maneras: abortos, listeriosis del recién nacido, meningitis, septicemia, artritis, listeriosis cutánea, etc., según las condiciones de la persona que la padece (estado inmune, embarazo, edad, enfermedades concomitantes, etc.) (Gómez-Mampaso, 1993; Pigrau, 1993), mientras que en los animales domésticos, las principales formas clínicas de la listeriosis son tres: abortiva (la más frecuente en bovino), septicémica (jóvenes) y nerviosa (animales adultos, principalmente en ovino y caprino) (Marco y González, 1993). Un estudio más detallado sobre la patogenidad del género *Listeria* y las formas clínicas que pueden desarrollar el hombre y los animales se puede encontrar en la tesis doctoral de Briones (1992).

I.B. LA LISTERIOSIS COMO ENFERMEDAD DE ORIGEN ALIMENTARIO

En circunstancias normales, las personas y animales sanos se hallan en equilibrio con los microorganismos presentes en el medio ambiente, coexistiendo en la Naturaleza sin producirse efectos adversos (Linton, 1982). Esta premisa, cierta para la mayoría de los microorganismos es, en el caso de *L. monocytogenes*, fundamental para entender su situación en la Naturaleza.

L. monocytogenes está presente de modo saprófito en gran cantidad de nichos medioambientales, considerándose su hábitat principal el suelo y la materia de origen vegetal en descomposición (Gray y Killinger, 1966; Weis y Seeliger, 1975). Por ello, algunos autores consideran que el suelo es el reservorio real de esta bacteria, tratándose de un microorganismo telúrico (Blenden y Szatalowicz, 1967; Welshimer y Donker-Voet, 1971; Ryser y Marth, 1991). Los vegetales también parecen ser importantes en el ciclo vital de las listerias en el medio ambiente, y se han propuesto como una fuente habitual de muchas infecciones (Murray, 1955; Welshimer y Donker-Voet, 1971). Otros hábitats naturales de *L. monocytogenes* son las aguas continentales (Watkins y Sleath, 1981; Dijkstra, 1982) y aguas residuales (Watkins y Sleath, 1981; Al-Ghazali y Al-Azawi, 1986).

En cuanto a la presencia de *L. monocytogenes* en los animales, se sabe que una gran variedad de especies pueden comportarse como sus hospedadores, habiéndose aislado a partir de mamíferos, aves, peces, anfibios, crustáceos, insectos y arácnidos (Gray, 1963; McCarthy, 1990).

Uno de los aspectos más importantes en la epidemiología y transmisión de la listeriosis es que la extraordinaria ubicuidad de *L. monocytogenes* permite su fácil acceso a los alimentos destinados al consumo humano y animal durante las diferentes fases de producción (Skovgaard, 1992).

En este sentido, la importancia de los alimentos como vehículo de transmisión de la listeriosis a los animales ha sido plenamente confirmada en numerosas ocasiones (Fenlon, 1986; Gray, 1960; Gronstol, 1979; Vázquez-Boland y col., 1992), destacando el papel fundamental que desempeña el consumo de ensilados contaminados con microorganismos del género *Listeria* (*L. monocytogenes* o *L. ivanovii*) en la aparición de casos clínicos de listeriosis (Gitter y col, 1986; Fernández-Garayzabal y col, 1992a; Vázquez-Boland y col., 1992). Así, una práctica incorrecta en la fabricación del silo (material empleado para su confección excesivamente húmedo, mal prensado, etc.) puede impedir la adecuada fermentación del producto (pH final inferior a 5,2), favoreciendo el crecimiento de *L. monocytogenes* presente naturalmente en éste (Marco y González, 1993). De esta forma, la bacteria alcanzaría unas cifras suficientemente altas como para producir la enfermedad de los animales susceptibles que consumieran el ensilado.

En el hombre, aunque la transmisión de la listeriosis puede ocurrir por diversas vías (vía transplacentaria, contagio del neonato durante el parto, heridas, etc.), sin embargo, la transmisión por vía digestiva es la forma más frecuente de acceso de *L. monocytogenes* a nuestro organismo (Gómez-Mampaso, 1993; Domingo y col., 1993).

Aunque desde hace tiempo el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de diversos tipos de alimentos destinados al consumo humano (Seeliger, 1961; Potel, 1953) sugirió el papel de los alimentos contaminados como una fuente potencial en la transmisión de la listeriosis al hombre, sin embargo, no ha sido hasta la década de los 80, en la que se registraron varios brotes de listeriosis causados por alimentos (Tabla 1.1), cuando ha quedado plenamente demostrada la importancia real de la listeriosis humana como una enfermedad de origen alimentario, lo que ha llevado a intensificar la investigación sobre la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, como veremos en el siguiente apartado.

Uno de los enigmas de la epidemiología de la listeriosis es que, a pesar de ser *L. monocytogenes* un microorganismo extremadamente ubicuo, sin embargo, los casos de cuadros clínicos que provoca son relativamente esporádicos. (Schuchat y col., 1992). De hecho, se considera que *L. monocytogenes* es un agente patógeno oportunista, actuando las personas y animales sanos como reservorios de este microorganismo (el 20% de las personas y animales son portadores de *L. monocytogenes*) (Kamplmacher y Van Noorle-Jansen, 1980; Domínguez, 1994). Pero ¿cual es el motivo de que unos individuos sean portadores del microorganismo y otros desarrollen la enfermedad? La respuesta a esta pregunta aún no es del todo clara; sin embargo, se sabe que la aparición de casos clínicos de listeriosis exige la concurrencia de diversos factores, no completamente caracterizados, y que radican tanto en la propia bacteria como en el hospedador y su entorno. Así, se considera que la aparición de un caso clínico exige la concurrencia de dos factores fundamentales: a) factores del hospedador, especialmente situaciones de disminución de la inmunidad de base celular (gestación inmunodepresión, estrés) y, probablemente, otros factores coadyuvantes (infecciones intercurrentes, microdeficiencias nutricionales, etc.); y b) alimentos contaminados con cantidades suficientes de *L. monocytogenes* dotadas de factores de virulencia activos (Briones, 1993).

Aunque no existen datos fiables respecto a las dosis necesarias para producir un

TABLA I.1. PRINCIPALES BROTES DE LISTERIOSIS DE ORIGEN ALIMENTARIO EN LOS ULTIMOS AÑOS

Año / Lugar	Alimento implicado	Nº afectados	Mortalidad	Serotipo	Referencia
1981 / Canadá	Ensalada de col	41	41,4 %	4b	Schlech y col., 1983
1983 / Estados Unidos	Leche pasteurizada	49	28,5 %	?	Fleming y col., 1985
1985 / Estados Unidos	Queso fresco	86	33,7 %	4b	James y col., 1985
1983-87 / Suiza	Queso fresco	122	27,8 %	?	Bille, 1988
1986-87 / Estados Unidos	Helados	36	0 %	Varios	Schwartz y col., 1989
1992 / Francia	Fiambre de cerdo	279	22,6 %	4b	Goulet y col., 1993

caso clínico de listeriosis, durante la investigación de algunos casos se ha podido identificar el agente causal aislado del enfermo con el aislado del alimento, habiéndose encontrado en estos casos unos recuentos de *L. monocytogenes* siempre superiores a 10^3 ufc/g (Wenger y col., 1990; Fernández-Garayzábal y col., 1992a). Sin embargo, como ya hemos comentado, la dosis que causa la aparición de un caso clínico varía en función de las condiciones del hospedador.

I.B.1. Presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos

Los brotes de listeriosis de origen alimentario ocurridos en la década de los 80 han llevado a una vigilancia más estrecha de la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos. Así, podemos decir que en los últimos años se ha investigado la presencia de *L. monocytogenes* en prácticamente todo tipo de alimentos destinados al consumo humano. Los resultados obtenidos a este respecto han sido muy variados, debido principalmente al número limitado de muestras estudiadas en distintas localizaciones y a la diversificación de la metodología empleada. A continuación, vamos a hacer un breve resumen de la incidencia de *L. monocytogenes* en algunos de los alimentos de mayor consumo.

I.B.1.a. Leche y productos lácteos

La leche y los productos lácteos son quizás los alimentos en los que más se ha centrado la investigación sobre la contaminación por *L. monocytogenes*, debido, sin duda, a la relación de estos productos con los brotes de listeriosis ocurridos entre 1983 y 1987 en Estados Unidos y Suiza (Tabla I.1).

L. monocytogenes puede infectar a las vacas lecheras en producción y, por tanto, aparecer en la leche secretada por éstas, debido principalmente al padecimiento de mastitis subclínicas sin alteración mamaria o de la leche. La incidencia de *L. monocytogenes* encontrada por diferentes autores en distintos tipos de leche se muestra en la Tabla I.2. En términos generales, ésta varía entre el 0,3 y el 45,3% y, aunque la mayor parte de estos estudios son únicamente cualitativos, en los casos en los que se han

TABLA I.2. PRESENCIA DE *L. monocytogenes* EN LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS

Alimento	Incidencia (%)	Referencia
Leche cruda de vaca	3,0 - 45,3	Lund y col., 1991; Domínguez y col., 1985
Leche pasteurizada de vaca	21,4	Fernández- Garayzábal y col., 1986
Leche cruda de oveja	0,3	Perales, 1993
Quesos de pasta blanda	4 - 16	Marth y Ryser, 1990
Queso (varios tipos)	0,5 - 12,9	Farber y col., 1987; Breer, 1986
Helados	3,7	Walker y col., 1991
Mantequilla	3,6	Morel y col., 1979

efectuado recuentos, éstos no suelen ser superiores a 10^2 UFC/ml (Hayes y col, 1986; Beckers y col., 1987; Fenton y Wilson, 1989).

En lo que se refiere a la presencia de *L. monocytogenes* en quesos, la incidencia varía entre un 0,5 a un 26,7%, habiéndose obtenido unos recuentos de incluso 10^5 a 10^7 UFC/g (Perales, 1993).

En cuanto a otros productos lácteos, investigaciones realizadas en los Estados Unidos han detectado la presencia de *L. monocytogenes* en aproximadamente un 2,5% de las muestras, entre las que se incluían batidos de chocolate y postres lácteos congelados de varios tipos. Debido a la capacidad de esta bacteria para crecer a temperaturas de refrigeración, ésta puede alcanzar una población de hasta 10^7 UFC/ml durante el almacenamiento de este tipo de productos (Marth y Ryser, 1990). También se ha aislado *L. monocytogenes* a partir de helados (Anónimo, 1987a; Walker y col., 1991), nata (Marcy y Mossel, 1984) y mantequilla (Morel y col., 1979).

I.B.1.b. Carne y productos cárnicos

Se ha aislado *L. monocytogenes* en muy diversos tipos de carne, si bien, la carne de ave y sus derivados son los que mayor incidencia presentan de todos los alimentos investigados (hasta el 85,0%) (Tabla I.3.), coincidiendo la mayoría de los numerosos estudios realizados, en que la contaminación aumenta a medida que se avanza el procesado y distribución del producto (como veremos en el apartado I.B.2). La cantidad de *L. monocytogenes* presentes en las muestras positivas es, sin embargo, escasa, no encontrándose habitualmente recuentos mayores de 10^2 UFC/g.

En cuanto a las carnes rojas, se observa una mayor presencia de *L. monocytogenes* en carne de porcino que en la carne de vacuno y ovino, ocurriendo que, como en el caso de la carne de aves, aumenta la incidencia según avanza el proceso de elaboración de la carne. Aunque son pocos los estudios en los que se haya efectuado un recuento de *L. monocytogenes* en las muestras positivas, se cree que en general no superan el valor de 5 UFC/g (Buchanan y col., 1989; Johnson y col., 1990). Respecto a los productos cárnicos, mención especial requiere el paté, donde se han obtenido

TABLA I.3. PRESENCIA DE *L. monocytogenes* EN CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS *

Alimento	Incidencia (%)	Referencia
Carne de vacuno	3,1 - 24,0	Cottin y col., 1985; Wong y col., 1990
Carne de porcino	5,0 - 58,8	Nicolas, 1985
Carne de ovino	14,3	Nicolas, 1985
Carne picada	5,0 - 38,0	Rorvik e Yndestad, 1991; Schonberg y col., 1989
Productos cármicos curados	2,7 - 72,2	Cantoni y col., 1988; Grau y Vandelinden, 1992
Productos cármicos cocidos	10,0 - 35,0	Morris y Ribeiro, 1989
Carne de pollo y pavo	2,1 - 85,0	Varabioff, 1990; Schonberg y col., 1989
Derivados de aves	12,0 - 79,3	Gilbert y col., 1989; Perales, 1993

* (Adaptado de Perales, 1993)

recuentos de hasta 10^6 UFC/g (Perales, 1993).

I.B.1.c. Otros alimentos

La mayoría de los muestreos realizados sobre la presencia de *L. monocytogenes* en pescados y mariscos han mostrado una incidencia entre el 2,2 y el 18,7% (Farber, 1991; Rorvik e Yndestad, 1991). Según estos estudios, no parece haber diferencias apreciables según se trate de pescado o marisco, y los recuentos suelen ser inferiores a 10^2 UFC/g.

En cuanto a los alimentos de origen vegetal, no han sido muchos los estudios realizados sobre la presencia de *L. monocytogenes* en ellos, aunque incluyen una variedad de vegetales. La incidencia encontrada en estos alimentos varía entre el 1,1% en coles y el 60,0% en patatas, presentando también una alta incidencia los rábanos (14,4%) y las setas (10%) (Heisik y col., 1989; Van Netten y col., 1989).

Finalmente, la presencia de *L. monocytogenes* en platos preparados parece ser elevada, tanto en platos cocinados como en los precocinados, siendo de destacar el alto porcentaje de muestras positivas encontradas en platos precocinados y congelados, que alcanza hasta un 34,0% (Wong y col., 1990; Saludes y Aguiar, 1994). La importancia de la presencia de *L. monocytogenes* en este tipo de alimentos radica fundamentalmente en que se trata de productos que se pueden consumir sin ningún tipo de tratamiento térmico (o con un tratamiento muy suave) que no garantiza la eliminación de *L. monocytogenes* presente en el alimento. Por tanto, debería suponerse la ausencia en estos productos de *L. monocytogenes* lo que, como hemos visto, no siempre ocurre, con el consiguiente riesgo para el consumidor.

I.B.2. Origen de la contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes*

Una de las fuentes más importantes de contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes* la constituyen los **enfermos y portadores inaparentes** que van diseminándola en el ambiente a través de la orina, heces y otras secreciones. Así, en el

caso de mastitis causadas por *L. monocytogenes* en el ganado bovino, ovino y caprino, este microorganismo es excretado en la leche de los animales afectados hasta tres meses después de la desaparición de los síntomas clínicos (Gitter y col., 1980), lo cual hace que esta leche sea un peligro potencial para el consumidor si no se le aplica el tratamiento térmico adecuado. Por otro lado, las heces procedentes de portadores de *L. monocytogenes* empleadas para el abonado de verduras y hortalizas podrían ocasionar que éstas se contaminasen con este microorganismo (Beuchat y col., 1989).

Otra fuente importante de contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes* es el **medio ambiente**. Como hemos visto anteriormente, *L. monocytogenes* es un microorganismo caracterizado por su gran ubicuidad, por lo que su presencia, por ejemplo, en las aguas de riego de verduras y hortalizas puede ocasionar una contaminación de estos alimentos por *L. monocytogenes* (Beuchat y col., 1990). La leche cruda puede también contaminarse con *L. monocytogenes* a partir del ambiente del establo, de los útiles de ordeño, e incluso de los operarios.

Los alimentos pueden también sufrir la contaminación por *L. monocytogenes* en las propias **industrias alimentarias**, habiéndose demostrado una incidencia de *L. monocytogenes* en mataderos del 30 al 65% (Lowry y Tiong, 1988), y del 7,6% en centrales lecheras (Anónimo 1987b).

En el caso de los quesos, la forma de contaminación *L. monocytogenes* puede ser bien a través de la materia prima (leche, cultivos iniciadores, cuajo, etc.), a partir del ambiente o los operarios de la fábrica, o durante su distribución y venta (Marth y Ryser, 1990). Cuando la contaminación del queso se produce a partir de la leche cruda empleada para su fabricación, el comportamiento de *L. monocytogenes* durante la maduración del queso varía dependiendo de su carga inicial en la leche y del tipo de madurado que se aplique, estando muy relacionado con la presencia de cultivos iniciadores y el descenso del pH del producto (Ver apartado I.B.3.b.).

En cuanto a las carnes, hay que señalar que la mecanización de los mataderos tanto de mamíferos como de aves, aumenta la contaminación por *L. monocytogenes* durante el procesado de las canales, lo cual hace lógico el mayor porcentaje de aislamientos de *L. monocytogenes* en estos alimentos a la salida de la planta (Skovgaard

y Morgen, 1988; Hudson y Mead, 1989; Ylla, 1993). Asimismo, los trabajadores y utensilios de la industrias alimentarias constituyen otra fuente importante de contaminación cruzada de los alimentos por *L. monocytogenes* durante su manipulación y procesamiento, e incluso durante el envasado y empaquetado (Elischerová y col., 1977; Nicolas, 1985; Lowry y Tiong, 1988; Ylla, 1993).

Finalmente, se ha encontrado que los **frigoríficos domésticos**, y las **cocinas** en general, podrían constituir otro lugar donde puede ocurrir la contaminación cruzada de los alimentos con *L. monocytogenes*, principalmente cuando se trata de productos no envasados individualmente, habiéndose encontrado que en una investigación llevada a cabo en Holanda, se determinó la presencia de *Listeria* spp. en el 20% de las cocinas estudiadas (Cox y col., 1989).

I.B.3. Control de la presencia y crecimiento de *L. monocytogenes* en los alimentos

Como hemos visto, las probabilidades de que un alimento se vea contaminado por *L. monocytogenes* son muy altas en todas las etapas de su procesado, desde la obtención de la materia prima hasta su transporte y distribución. Como resulta muy difícil evitar esta contaminación, la forma de impedir que los alimentos contaminados con esta bacteria supongan un peligro para el consumidor consiste en aplicarles algún tipo de tratamiento que, bien destruyan a *L. monocytogenes*, o bien impidan su crecimiento, sin que se produzca la alteración de las características nutritivas y organolépticas del alimento.

I.B.3.a. Tratamientos aplicados para la destrucción de *L. monocytogenes*

Se puede decir que el único tratamiento eficaz al que se puede someter un alimento contaminado con *L. monocytogenes* y que permite asegurar la total destrucción de *L. monocytogenes* presentes es la aplicación de **altas temperaturas**. Por supuesto, no todos los alimentos son susceptibles de ser sometidos a este tratamiento, estando fundamentalmente destinado a los alimentos líquidos, principalmente la leche, tanto la destinada al consumo como a la elaboración de productos lácteos.

En este sentido, la efectividad de los diversos tratamientos aplicados a la leche es distinta. Así, el tratamiento de esterilización y UHT de la leche no presentan ninguna duda sobre su efectividad frente a *L. monocytogenes*, asegurando su total destrucción. Sin embargo, con respecto a la pasteurización, la efectividad del tratamiento depende de la carga de *L. monocytogenes* en la leche, habiéndose encontrado que el límite de *L. monocytogenes* que es destruida por la pasteurización es de 10^5 - 10^6 UFC/ml (Fernández-Garayzábal y col., 1986 y 1987; Doyle y col., 1987; Lovett y col., 1990). Aunque algunos autores opinan que la presencia intracelular de *L. monocytogenes* en los fagocitos podría representar una fórmula de protección que permitiera al microorganismo evitar el efecto destructivo del calor (Barza, 1985; Bunning y col., 1986; Doyle y col., 1987), hay que tener en cuenta que el proceso de homogeneización habitual de la leche, previo al tratamiento, liberaría la mayor parte de las bacterias contenidas en los macrófagos, haciéndolas sensibles a éste.

En cuanto a la aplicación de tratamientos térmicos a otro tipo de alimentos, tales como la carne y productos cármicos, es necesario señalar que, dadas las características de estos alimentos, los tratamientos aplicables en ellos no son suficientes como para destruir a *L. monocytogenes*, estando destinados fundamentalmente a disminuir lo más posible su presencia (Mackey y Bratchell, 1989; Mackey y col., 1990)

I.B.3.b. Tratamientos aplicados para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes*

Una de las principales formas de evitar el crecimiento de los microorganismos patógenos presentes en los alimentos es la **refrigeración**, evitando así principalmente el desarrollo de las bacterias mesófilas. Sin embargo, *L. monocytogenes* puede crecer a temperaturas entre 0 y 5°C en la mayoría de los alimentos (Rosenow y Marth, 1987; Sizmur y Walker, 1988; Berrang y col., 1989; Lovett y col., 1990; Fernández-Garayzábal y Blanco, 1993), siendo uno de los pocos microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos que puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración. Esta característica es especialmente importante, ya que en caso de almacenamiento prolongado de un alimento a estas temperaturas, *L. monocytogenes* puede alcanzar cifras potencialmente peligrosas a la hora de su consumo.

Otra manera de evitar el crecimiento de *L. monocytogenes* en un alimento es modificando las características físico-químicas de éste. Existen dos formas principales de producir estas modificaciones:

a) Mediante la incorporación al alimento de determinados **cultivos iniciadores** que, por su propia actividad sobre los componentes del alimento, produzcan un cambio en él (p.e., la modificación del pH), o que liberen sustancias al medio (bacteriocinas) que inhiban el crecimiento de *L. monocytogenes*. En este sentido, se conoce desde hace tiempo que el crecimiento de *L. monocytogenes* en diversos tipos de leche fermentada se ve inhibido debido al efecto acidificante ejercido por la flora láctica mesófila (*Streptococcus cremoris* y *S. lactis*) y termófila (*S. thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) (Schaack y Marth, 1988a y 1988b). Igualmente, se ha comprobado que algunas bacterias responsables de la fermentación de diversos productos cármicos (principalmente del género *Pediococcus*) aceleran la inactivación de *L. monocytogenes* debido a la producción de bacteriocinas (p.e. pediocina AcH); sin embargo, parece ser que la efectividad de estas bacteriocinas varía con la cepa de *L. monocytogenes*, entre otros factores, y que, en determinadas circunstancias, las listerias lesionadas pueden recuperarse (Foegeding y col., 1992; Motlagh y col., 1992).

b) Mediante la adición de **productos químicos o biológicos**. Así, se puede modificar el pH de un alimento añadiendo determinados ácidos orgánicos o inorgánicos. En este sentido, el efecto de la acidificación del producto está en función de la temperatura: el pH mínimo de crecimiento *L. monocytogenes* aumenta conforme disminuye la temperatura (George y col., 1988; Farber y col., 1989), mientras que la inactivación de esta bacteria en condiciones de acidez es más lenta a temperaturas de refrigeración que a temperatura ambiente (Parish y Higgins, 1989). Por otro lado, la incorporación de nisina (una bacteriocina producida por algunas cepas de *Lactococcus lactis*) a los alimentos, sobre todo en medios ácidos, puede contribuir a la reducción de la población de *L. monocytogenes*, aunque el desarrollo de mutantes resistentes puede reducir la eficacia de su utilización habitual (Benkerroum y Sandine, 1988; Harris y col., 1991).

I.B.4. Destino de los alimentos contaminados. Criterio de los Organismos Oficiales

La listeriosis como enfermedad de origen alimentario ha recibido una atención especial en los últimos años por parte de organismos oficiales de todo el mundo. La OMS considera que las enfermedades transmitidas por alimentos en general, y algunas de ellas en particular son uno de los problemas de salud pública más extendido en el mundo contemporáneo, y una causa muy importante de pérdida de productividad para los países, industrias y consumidores (Quevedo, 1993).

En el caso de la listeriosis, la OMS convocó en 1988 una reunión de un grupo de trabajo con el fin de establecer unas recomendaciones a las autoridades nacionales de salud pública y a la industria alimentaria que evitaran la aparición de nuevos brotes de la enfermedad. Entre estas recomendaciones se incluía, por ejemplo, la puesta en práctica del sistema ARICPC (Análisis de Riesgos e Identificación y Control de Puntos Críticos) en las industrias como el mejor camino para garantizar la inocuidad y la calidad de los alimentos (OMS, 1986 y 1988).

Los responsables de Salud Pública de la Unión Europea, siguiendo las recomendaciones de la OMS, también han tenido en cuenta la importancia de la listeriosis a la hora de establecer normativas respecto a la calidad microbiológica de los alimentos. Así, hay una serie de reglamentaciones de la UE, ya aprobadas o en discusión a diferentes niveles de decisión, que proponen medidas de control con el fin de proteger la Salud Pública y evitar al mismo tiempo obstáculos al libre mercado único (Sanabria, 1993).

En este sentido, el interés que suscita la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos llevó al Consejo de las Comunidades Europeas a la publicación de la Directiva 92/46/CEE (DOCE L-268; 14-09-1992), que ha sido recientemente incorporada a la Legislación española por el Real Decreto 1679/1994 (BOE nº 229; 24-09-1994). En éste se establecen las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos, determinándose en el capítulo II de este Real Decreto los criterios microbiológicos aplicables a los productos lácteos y a la leche de consumo. Con respecto a *L. monocytogenes*, se establece la ausencia de esta bacteria en 25g en quesos distintos de los de pasta dura y su ausencia en 1g en otros productos, no siendo obligatoria su búsqueda en la leche conservada y los productos

lácteos tratados térmicamente tras y durante el envasado y el embalado.

Sin embargo, no se han establecido normativas en ningún otro tipo de productos alimenticios, por lo que existe un vacío legal a la hora de establecer los límites de la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos distintos de la leche y productos lácteos.

Por otro lado, existen varios aspectos problemáticos respecto al análisis oficial de alimentos en relación con *L. monocytogenes*, siendo de destacar, entre otros la pluralidad de métodos que se pueden emplear, ausencia de métodos analíticos oficiales de referencia, carencia de programas de muestreo y de normas microbiológicas. En este sentido, es necesario evaluar métodos de detección de *L. monocytogenes* que se adapten a las distintas características de los alimentos, ya que por su naturaleza o por los distintos tratamientos industriales a que se someten podrían ocasionar lesiones subletales en los microorganismos, lo que a su vez puede originar modificaciones de la técnica a utilizar (Blanco, 1993).

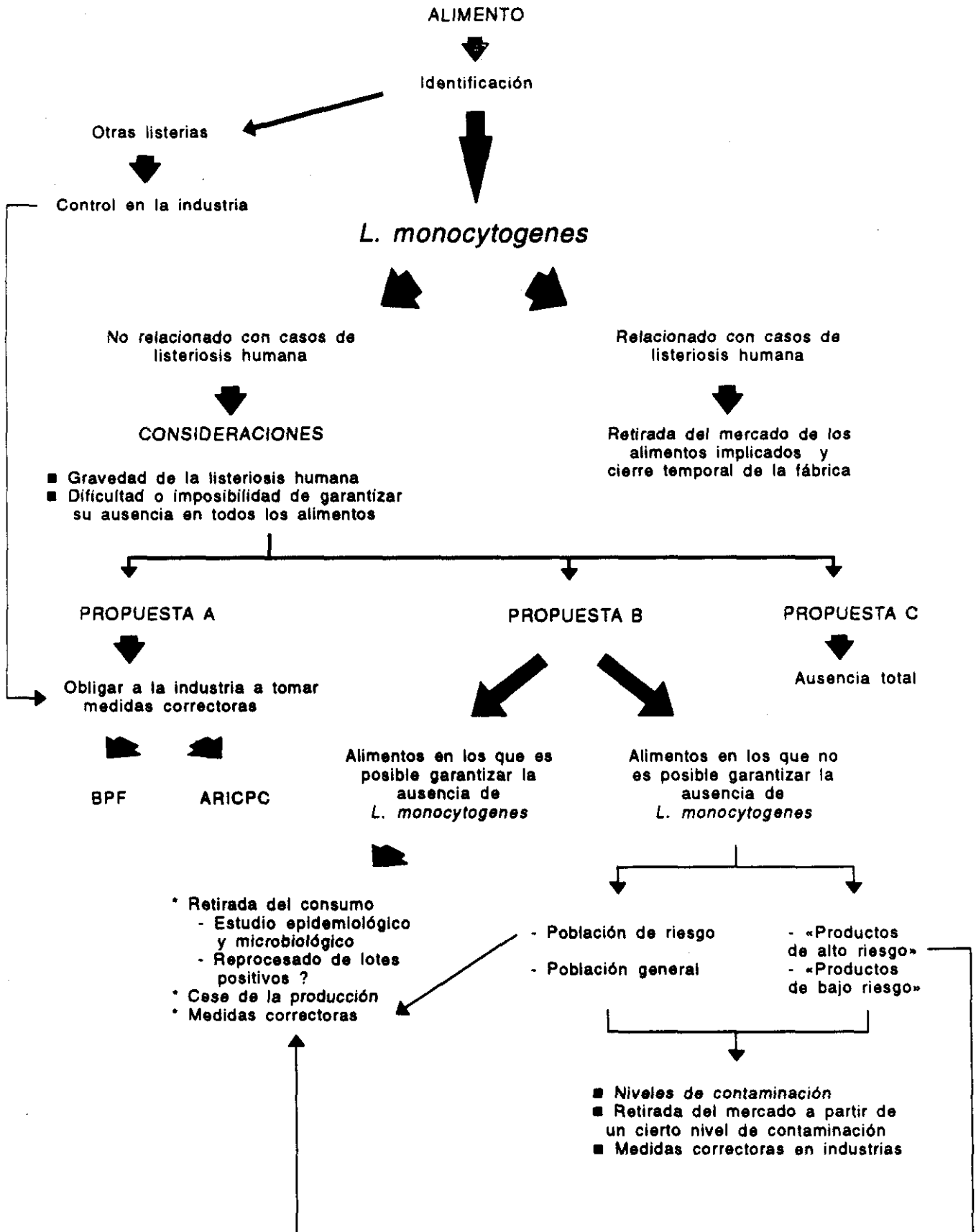
Otro aspecto importante en cuanto a la determinación de la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, es el criterio a seguir cuando se detecta esta bacteria tanto en un alimento como en una industria productora. En este sentido, se han propuesto una serie de alternativas a seguir dependiendo de determinados factores que incluyen, desde la especie de *Listeria* aislada, hasta el tipo de consumidores a los que va destinado el alimento (Anónimo, 1991; Moreno, 1993; ICMSF, 1994). En el Esquema I.1 se representan las alternativas a seguir según estas propuestas.

I.C. EFECTOS DE LA CONGELACION DE LOS ALIMENTOS SOBRE *L. monocytogenes*

Muchas de las muestras de alimentos o de sus ingredientes que se remiten a los laboratorios para su análisis microbiológico son congelados cuando el laboratorio al que se envían se encuentra lejos del lugar de origen, pudiendo sufrir uno o varios ciclos de descongelación y congelación durante su procesamiento. Estos procedimientos, debido a los efectos letales y subletales de la congelación y descongelación sobre las células bacterianas, pueden conducir a falsear el resultado del análisis microbiológico y, por tanto, de la calidad real de los productos. Esto es debido a que estas células, aunque constituyen

ESQUEMA 1.1

ACTUACIONES CON ALIMENTOS EN LOS QUE SE HA DETECTADO LA PRESENCIA DE *Listeria* spp. (Adaptado de Moreno, 1993)



parte de la población viable total, tienen algunas de sus características fisiológicas alteradas, y un método específico utilizado en el análisis microbiológico de una muestra podría no detectarlas (Ray, 1989).

I.C.1. Susceptibilidad de *L. monocytogenes* a la congelación

Los efectos de la congelación sobre *L. monocytogenes*, así como la presencia de esta bacteria en alimentos congelados no ha merecido la consideración de los investigadores hasta hace bien poco tiempo. Sin embargo, la presencia de *L. monocytogenes* en productos congelados parece ser abundante, habiéndose aislado en los últimos años a partir de una gran variedad de alimentos congelados, incluyendo productos lácteos, carne, mariscos y platos precocinados (Weagant y col., 1988; Varabioff, 1990; McCarthy y col., 1990; Wong y col., 1990; Walker y col., 1991; Saludes y Aguiar, 1994).

La mayoría de los autores que han estudiado la susceptibilidad de *L. monocytogenes* a la congelación coincide en que *L. monocytogenes* es bastante resistente a los efectos letales de la congelación (Golden y col., 1988a y 1988b; Oscroft, 1989; Palumbo y Williams, 1991; Warburton y col., 1992). De toda la bibliografía consultada, únicamente hemos encontrado un caso en el que señalen una elevada muerte celular, entre el 58 y el 93% (El-Kest y Marth, 1991a); esta diferencia se debe, probablemente, a que el medio de suspensión de *L. monocytogenes* empleado por la mayoría de los autores era un caldo nutritivo, mientras que el empleado por El-Kest y Marth era tampón salino (PBS). La influencia del medio de suspensión en el que se encuentra *L. monocytogenes* sobre el efecto de la congelación se analizarán en el apartado I.C.2.

En lo que respecta a las listerias que han sufrido algún tipo de daño subletal causado por la congelación, los resultados han sido dispares, variando principalmente en función de los medios empleados para diferenciar las células sanas de las alteradas. Se conoce desde hace tiempo que las bacterias que han sufrido alguna lesión subletal ven aumentada su sensibilidad al cloruro sódico, por lo que la mayoría de los autores han utilizado un medio nutritivo suplementado o no con distintas cantidades de cloruro sódico

para diferenciar las bacterias sanas de las dañadas subletalmente (Golden y col., 1988a; El-Kest y Marth, 1991a y 1991b; Palumbo y Williams, 1991; Budu-Amoako y col., 1992; Yu y Fung, 1993). Así, Golden y col. (1988a) determinaron que la presencia de células dañadas subletalmente tras la descongelación era óptima mediante la comparación del crecimiento en agar triptosa fosfato (donde crecen todas las células viables) y el mismo medio suplementado con cloruro sódico al 6-8% (donde se inhibe el crecimiento de las células lesionadas). De esta manera, encontraron que tras 14 días a -20°C, más del 82% de la población viable de *L. monocytogenes* había sufrido un daño subletal. Igualmente, otros autores emplearon concentraciones de cloruro sódico entre el 5 y el 6% (El-Kest y Marth, 1991a y 1991b; Palumbo y Williams, 1991; Budu-Amoako y col., 1992; Yu y Fung, 1993). Los únicos datos discrepantes a este respecto parecen ser los de Martin y Katz (1993), quienes encontraron un crecimiento similar en el medio nutritivo sin suplementar y suplementado con cloruro sódico. La explicación a estos resultados se podría atribuir a la proporción de cloruro sódico utilizada (2%), que no es suficiente para inhibir el crecimiento de las bacterias lesionadas, por lo que los recuentos efectuados en este medio no indicaban el número de *L. monocytogenes* sin dañar, sino el número de *L. monocytogenes* totales.

Las bacterias lesionadas, además de ser más sensibles al cloruro sódico, también son menos resistentes a la acción de la mayoría de los agentes que se emplean en la formulación de medios selectivos. Así, en el caso de *L. monocytogenes*, cuanto mayor sea la selectividad del medio empleado, peor será el crecimiento de las listerias dañadas subletalmente; por tanto, la diferencia de crecimiento de *L. monocytogenes* entre un medio nutritivo común y un medio selectivo constituye un índice para determinar la presencia de bacterias dañadas subletalmente.

En este sentido, los resultados obtenidos sobre la capacidad de diversos medios selectivos para permitir el crecimiento de *L. monocytogenes* tras sufrir un proceso de congelación/descongelación han sido muy variados. Así, algunos investigadores encontraron que determinados medios selectivos apenas afectaron a la capacidad de crecimiento de *L. monocytogenes* tras su congelación (-20°C, 14 días) con respecto al crecimiento en un medio nutritivo no selectivo (Golden y col., 1988b; Oscroft, 1989). Los medios selectivos empleados fueron los siguientes: MLA (McBride y Girard, 1960), GBNTSA (Martín y col., 1984), MDA (Despierrez, 1971), MMA (Lovett y col., 1987), LSAM

(Domínguez y col., 1984), DLEA (Donnelly y Baigent, 1986) y OXFORD (Curtis, y col., 1989). Otros autores, por el contrario, encontraron una gran variación en el crecimiento de *L. monocytogenes* en los medios selectivos antes y después de la congelación (Palumbo y Williams, 1991; Warburton y col., 1992). Los medios empleados en este caso fueron LPM (Lee y McClain, 1986), CNP (Loessner y col., 1988), MLA (McBride y Girard, 1960), MVJ (Buchanan y col., 1987), ARS-MMB (Buchanan y col., 1987), OXFORD (Curtis y col., 1989), MOX (McClain y Lee, 1989) y PALCAM (Van Netten y col., 1989). En general, los medios más selectivos se mostraron más inhibidores frente al crecimiento de *L. monocytogenes* tras un proceso de congelación.

I.C.2. Factores que influyen en la sensibilidad de *L. monocytogenes* a la congelación

La disparidad de resultados encontrados en cuanto al daño subletal que ocasiona la congelación a *L. monocytogenes* puede ser debida a la variación en las cepas y la metodología empleadas (tiempos de almacenamiento, medios de cultivo, etc). Vamos a comentar a continuación los factores más importantes que pueden influir en la sensibilidad de *L. monocytogenes* a la congelación.

Cepas de *L. monocytogenes*: En la mayoría de los estudios se han empleado varias cepas simultáneamente, principalmente de los serotipos 1/2a y 4b, no habiéndose encontrado, en general, diferencias en cuanto al comportamiento de las distintas cepas si el resto de la metodología empleada era igual (Golden y col., 1988a y 1988b; Palumbo y Williams, 1991; Warburton y col., 1992; Budu-Amoako y col., 1992; Yu y Fung, 1993). Otros autores, sin embargo, encontraron algunas diferencias en el comportamiento entre las distintas cepas empleadas, aunque pareció tener cierta influencia el medio de suspensión empleado (Oscroft, 1989; El-Kest y Marth (1991a). Así, Oscroft (1989) señala que la cepa de *L. monocytogenes* CRA 433 fue notablemente más sensible que el resto de las cepas empleadas en su estudio (Scott A y CRA 710) cuando el medio de suspensión era homogeneizado de zanahoria, comparado con un homogeneizado de pollo. El-Kest y Marth (1991a) emplearon también varias cepas en sus estudios acerca de los efectos de la congelación en *L. monocytogenes* (Scott A, V7, California y Ohio), observando que la cepa Scott A se mostró más resistente que las demás a la congelación cuando el medio de suspensión era PBS, mientras que cuando se empleaba caldo triptosa

la cepa más sensible era *L. monocytogenes* California.

Fase de crecimiento celular: Aunque se ha indicado que las células bacterianas en fase logarítmica de crecimiento son más sensibles a la congelación que las que se encuentran en fase estacionaria (Brown, 1993), en el caso de *L. monocytogenes* no parece ocurrir lo mismo. Así, aunque la mayoría de los autores emplean cultivos de *L. monocytogenes* en fase estacionaria, Oscroft (1989) comparó el comportamiento de tres cepas de *L. monocytogenes* en fase logarítmica y en fase estacionaria, no encontrando diferencias en cuanto a la sensibilidad a la congelación. Sí parece tener cierta influencia la edad del cultivo; así Warburton y col (1992) emplearon cultivos de 24 horas, 7 días y seis meses, observando mayor sensibilidad a la congelación en los cultivos de seis meses.

Cantidad de inóculo: Aunque en la bibliografía consultada ninguno de los autores señala la influencia que el inóculo de bacterias puede tener sobre su sensibilidad a la congelación, parece ser que cuando se halla presente una gran cantidad de microorganismos, la pérdida de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana que ocurre durante la congelación, proporciona cierto grado de crioprotección. Este efecto se produciría igualmente aun cuando las bacterias presentes fueran distintas de *L. monocytogenes*, por ejemplo, en el caso de alimentos congelados con gran cantidad de microflora bacteriana propia (Brown, 1993).

Medio de suspensión: En general, el medio de suspensión empleado por los distintos autores ha sido un caldo nutritivo; sin embargo, como hemos comentado antes, algunos autores han empleado otros medios. Así, Oscroft (1989) y Palumbo y Williams (1991) emplearon homogeneizados de distintos alimentos, encontrando que *L. monocytogenes* era más sensible a la congelación cuando se hallaba suspendida en homogeneizados cuyo pH era más bien ácido. El-Kest y Marth (1991a) comprobaron la mayor resistencia de *L. monocytogenes* a la congelación cuando empleaban leche o triptosa fosfato para suspender las bacterias en lugar de PBS y, además, que cuando el tiempo de almacenamiento en congelación era prolongado (más de dos semanas) el glicerol incorporado al medio de suspensión se comportaba como un crioprotector altamente efectivo (El-Kest y Marth, 1991b).

Velocidad de congelación: Se ha comprobado que la velocidad de congelación afecta a

la viabilidad de las células bacterianas mediante la formación de cristales que afectan a la estructura celular. Así, a velocidad de congelación lenta, se forman grandes cristales de hielo que se mueven lentamente a través del alimento, concentrando los solutos en su frente. Los microorganismos son expuestos a altas concentraciones de solutos y los grandes cristales de hielo se forman fuera de la célula. A velocidades rápidas de congelación se forman numerosos y pequeños cristales de hielo dentro y fuera de la célula y los solutos no se concentran como en el caso anterior. Las células microbianas mantienen su tamaño normal, aunque pueden mostrar alguna distorsión y perder la integridad de su membrana, ya que los cristales de hielo formados son lo suficientemente pequeños como para desorganizar la arquitectura de la membrana (Brown, 1993). En el caso de *L. monocytogenes*, aunque no disponemos de muchos datos al respecto, parece ser que tanto la velocidad de congelación como la de descongelación de un homogeneizado en el que se halla suspendido un cultivo de *L. monocytogenes* no tienen influencia sobre la viabilidad de estas bacterias tras el tratamiento (Oscroft, 1989).

Tiempo de almacenamiento en congelación: En este aspecto existen diferentes resultados. Así, mientras Oscroft (1989) y Palumbo y Williams (1991) no encuentran diferencias notables en la supervivencia de *L. monocytogenes* tras 12 y 14 semanas respectivamente en congelación, El-Kest y Marth (1991a) señalan un descenso de la viabilidad, así como una lesión celular notables tras 4 semanas en congelación cuando el medio de suspensión era PBS, aunque estos mismos autores afirman que tanto la muerte como el daño celular ocurren principalmente durante las primeras horas de la congelación. Warburton y col. (1992) también comprobaron una menor recuperación de *L. monocytogenes* en medios selectivos tras largo tiempo (hasta 6 meses) de permanecer en congelación los cultivos de *L. monocytogenes*.

I.C.3. Reparación de *L. monocytogenes* dañada subletalmente

Las células de *L. monocytogenes* que hayan sufrido una lesión subletal durante cualquier fase del procesamiento de un alimento pueden recuperarse en el producto acabado durante el almacenamiento en refrigeración. No se conocen muchos datos con respecto a la recuperación de *L. monocytogenes* tras la congelación, habiéndose realizado la mayor parte de los estudios en cultivos que habían sufrido un tratamiento térmico. Así,

se conoce que *L. monocytogenes* es capaz de recuperar sus condiciones iniciales tras un tratamiento subletal, entre ellas, su poder patógeno (Busch y Donnelly, 1992). En este sentido se ha comprobado que cultivos de *L. monocytogenes* dañados subletalmente por calor es tan patógena tras su recuperación como cultivos no tratados cuando se han inoculado en ratones inmunocomprometidos (McCarthy, 1991).

Según los estudios de varios autores (Buchanan y col., 1988; Busch y Donnelly, 1992), y refiriéndose a *L. monocytogenes* que han sufrido un tratamiento térmico subletal, al menos se requieren de 6-9 horas de incubación en un ambiente no inhibitorio para reparar el daño celular ocasionado por un tratamiento subletal, recuperando así su resistencia al cloruro sódico y otros agentes selectivos.

I.C.4. Implicación en Microbiología de los alimentos

Según Ray (1993), hay tres consideraciones que hacer con respecto al efecto que puede ocasionar la presencia de bacterias dañadas subletalmente en los alimentos:

- 1.- Muchos de los tratamientos aplicados a los alimentos para su producción comercial y conservación ocasionan daños subletales a los microorganismos.
- 2.- Muchos microorganismos que sufren lesiones subletales son utilizados como indicadores de la calidad microbiológica del alimento, o son empleados como cultivos iniciadores, o son causantes de enfermedades de origen alimentario, siendo éste el caso de *L. monocytogenes*. En este sentido, ya hemos comentado que *L. monocytogenes* recuperada tras un tratamiento subletal recupera también su poder patógeno. Así, un alimento contaminado con *L. monocytogenes* que haya sufrido un tratamiento subletal (como la congelación) y que posteriormente fuera almacenado en refrigeración retrasaría, pero no impediría, el crecimiento de *L. monocytogenes*, pudiendo ocasionar el desarrollo de listeriosis en el consumidor.
- 3.- Muchos de los productos químicos a los que las bacterias lesionadas son sensibles, se utilizan en la formulación de medios selectivos recomendados para la detección de microorganismos patógenos o indicadores entre la flora mixta presente en un alimento. En

este sentido, aunque *L. monocytogenes* es bastante resistente a la congelación, y los procedimientos de congelación y descongelación pueden reducir el número de microorganismos competidores, permitiendo el aislamiento de *L. monocytogenes* más fácilmente (Varavioff, 1990), sin embargo, la falta de capacidad para mantener su resistencia a los agentes selectivos empleados en los medios de cultivo podría conllevar una falta de detección cuantitativa, debido a que el medio de aislamiento es capaz de permitir sólo el crecimiento de las células sanas.

I.D. METODOS DE DETECCION DE *Listeria* y *L. monocytogenes* EN LOS ALIMENTOS

La investigación en la epidemiología de la listeriosis humana y animal, y en la distribución ecológica de los microorganismos del género *Listeria* han ido paralelas a la evolución y desarrollo de los métodos de detección de estos microorganismos. En un principio, la mayoría de las técnicas utilizadas fueron desarrolladas para el diagnóstico microbiológico de *L. monocytogenes* a partir de muestras clínicas. En estos casos, las muestras consistían fundamentalmente en líquido cefalorraquídeo, sangre e hígado, por lo que el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de ellas era relativamente fácil en el caso de ser el microorganismo causante del proceso, ya que en un medio nutritivo las listerias crecían prácticamente en cultivo puro. Sin embargo, pretender detectar listerias directamente a partir de muestras contaminadas naturalmente con otro tipo de microorganismos, como es el caso de las heces, muestras ambientales o alimentos, ha sido hasta hace poco tiempo imposible. Esto era debido a que la población de *Listeria* en estos sustratos es generalmente baja, y su presencia se veía enmascarada por el crecimiento de la microflora natural de la muestra. Los recientes brotes de listeriosis humana relacionados con el consumo de determinados alimentos (Tabla I.1) han subrayado la necesidad de estudiar en profundidad la epidemiología de esta enfermedad y, por tanto, mejorar las técnicas de aislamiento e identificación de los microorganismos del género *Listeria* a partir de los alimentos destinados al consumo humano y animal. Así, últimamente se han desarrollado medios de cultivo lo suficientemente selectivos como para permitir el aislamiento directo de *L. monocytogenes* a partir de muestras altamente contaminadas con otros microorganismos, e igualmente nuevas técnicas inmunológicas y moleculares. De esta manera se ha recogido gran cantidad de datos sobre importantes cuestiones en relación con la epidemiología de la listeriosis y su prevención, poniéndose

de manifiesto su verdadera importancia como una enfermedad de transmisión alimentaria.

I.D.1. Métodos inmunológicos y moleculares

En los últimos años se han descrito varias técnicas, principalmente inmunológicas y moleculares para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos. Aunque estos métodos han sido validados experimentalmente, pocas son, en realidad los que se aplican como técnicas de rutina en los laboratorios de Microbiología de Alimentos. Esto es debido, fundamentalmente, a que en la mayoría de los casos se requiere un enriquecimiento previo de la muestra según la metodología clásica, y una confirmación microbiológica de las muestras positivas, además de la disponibilidad de unos equipos caros y personal bien entrenado.

A continuación haremos una breve referencia a los métodos inmunológicos y moleculares para después abordar con más detalle los métodos microbiológicos clásicos de aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* a partir de alimentos.

I.D.1.a. Técnicas inmunológicas

Las principales pruebas inmunológicas desarrolladas para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos se basan fundamentalmente en el empleo de anticuerpos monoclonales obtenidos frente a proteínas presentes en todas las especies del género aplicados a una técnica ELISA. En esto se basa, por ejemplo, la prueba *Listeria*-Tek (Organon Teknika Corp. Durham, NC) (Butman y col., 1998; Durham y col., 1990), el sistema VIDAS-*Listeria* (BioMérieux) o la prueba EIA (Sorin y col. (1992).

La ventaja de estas técnicas ELISA es que permiten el procesamiento de gran cantidad de muestras, con lo que en el caso de resultar el análisis negativo son de gran utilidad. Sin embargo, únicamente pueden detectar la presencia o ausencia de microorganismos del género *Listeria* en la muestra, sin precisar si se trata de *L. monocytogenes* o de alguna otra especie, siendo, además técnicas cualitativas que no dicen el número de listerias presentes en las muestras. Así, en el caso de muestras

positivas, se debe continuar el proceso hasta la identificación de las especies presentes (Saludes y Aguiar, 1994). Este inconveniente ha sido, en parte, solventado mediante el empleo de anticuerpos monoclonales frente a la hemolisina de *L. monocytogenes*, como han descrito Bartha y col. (1992) en su técnica HL-*L. monocytogenes*, con lo que una prueba positiva indicaría la presencia de esta bacteria en la muestra sin la necesidad de una identificación posterior. No obstante, sigue siendo una prueba cualitativa que no indica el nivel de contaminación del alimento.

Además de la técnica ELISA existen otras pruebas inmunológicas para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos, como la inmunofluorescencia directa (McLauchin y Pini, 1989), la combinación de inmunofluorescencia y una técnica de microcolonias (Sheridan y col., 1981), o pruebas inmunoenzimáticas en membrana (Schubert y Pawelzik, 1992). Estos métodos, sin embargo, presentan los mismos inconvenientes que la técnica ELISA, requiriendo una confirmación posterior de la presencia de *L. monocytogenes* en el caso de resultar la prueba positiva.

I.D.1.b. Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares y su aplicación a la detección de patógenos de difícil aislamiento han experimentado un gran desarrollo en los últimos diez años, y la investigación sobre la detección y aislamiento de *L. monocytogenes* no podía ser ajena a estos avances. Así, los estudios sobre métodos moleculares para la detección de *L. monocytogenes* a partir de alimentos han experimentado un gran desarrollo en los últimos años, que ha ido parejo al conocimiento de los genes de virulencia de esta bacteria.

Uno de los avances más importantes respecto a la detección de *L. monocytogenes* mediante técnicas moleculares ha sido el desarrollo de sondas genéticas y su aplicación a las técnicas de **hibridación de ácidos nucleicos** (Datta y col., 1987, 1988 y 1993; Klinger y col., 1988; Klinger y Johnson, 1988; King y col., 1989 y 1990; Emond y col., 1993).

La especificidad de las sondas varía dependiendo de los genes, e incluso de los

fragmentos de éstos elegidos para su elaboración. Así, la mayoría de estas sondas se han desarrollado tomando como base regiones diagnósticas del gen que codifica el ARN 16S (Klinger y col., 1988 ; Klinger y Johnson, 1988; King y col., 1989 y 1990; Emond y col., 1993), o bien fragmentos del gen que codifica la β -hemolisina de *L. monocytogenes* (Datta y col., 1987, 1988 y 1993), tratándose en este último caso de sondas específicas para *L. monocytogenes*. Sin embargo, las sondas elaboradas a partir de fragmentos del ARN 16S únicamente pueden determinar la presencia de *Listeria*, diferenciándola del resto de los géneros.

La importancia de la especificidad de la técnica radica en que, al aplicarla al análisis de un alimento, la determinación de la presencia de *Listeria* en éste no implica necesariamente que la contaminación se deba a *L. monocytogenes*, sino que puede deberse a cualquier otra especie no patógena del género. Como lo fundamental es la detección de *L. monocytogenes*, que, como hemos visto en el apartado I.A.3, es la especie patógena para el hombre, es interesante el empleo de sondas específicas para esta especie, evitando el aislamiento e identificación posteriores.

En cuanto a la utilidad de estas técnicas de hibridación para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos, se ha comparado la eficacia de la mayoría de ellas con los métodos microbiológicos clásicos en una gran variedad de alimentos y muestras ambientales, bien inoculados con listerias (Datta y col., 1988 y 1993; Klinger, 1988; Emond y col., 1993; King, 1990; Bubert y Goebel, 1992) o naturalmente contaminados (Bubert y Goebel, 1992). Los resultados en estos ensayos han demostrado la eficacia de estas técnicas para el análisis de *Listeria* en alimentos, con unos niveles de sensibilidad y especificidad de hasta el 100% en el caso de muestras inoculadas, y de hasta el 97% en el caso de productos naturalmente contaminados con *Listeria* (Bottari y col., 1992).

Otro método descrito hace relativamente poco tiempo, y aplicado también últimamente a la detección de *L. monocytogenes* es la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Así, se ha descrito un gran número de sistemas de detección de *L. monocytogenes* basadas en la aplicación de la PCR (Bessen y col., 1990; Golsteyn y col., 1991 y 1992; Holmstrom y col., 1992; Bubert y Goebel, 1992; Starbuck y col., 1992; Niederhauser y col., 1992; Wang y col., 1992), aunque sólo algunos autores han estudiado su utilidad para la determinación de la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos

(Bessen y col., 1990; Golsteyn y col., 1991; Starbuck y col., 1992; Niederhauser y col., 1992; Wang y col., 1992).

Dado el conocimiento que se tiene actualmente sobre la estructura genética de *L. monocytogenes*, ha sido posible que la mayoría de estas técnicas sean tan específicas como para determinar la presencia de *L. monocytogenes*, diferenciándola, por tanto, de las demás especies del género (Bessen y col., 1990; Golsteyn y col., 1991 y 1992; Holmstrom y col., 1992; Starbuck y col., 1992; Niederhauser y col., 1992; Wang y col., 1992). Así, la mayoría de los autores que han diseñado métodos de detección de *L. monocytogenes* en alimentos por PCR se han basado en la amplificación de fragmentos del gen de la hemolisina y regiones diagnósticas del gen que codifica el ARN 16S (Bessen y col., 1990; Golsteyn y col., 1991; Starbuck y col., 1992; Niederhauser y col., 1992; Wang y col., 1992).

La sensibilidad de estas técnicas parece ser, en general, muy alta cuando se aplica tras una fase de enriquecimiento de las muestras. Así, Niederhauser y col. (1992) llegan a detectar 10 *L. monocytogenes*/10g de diversos alimentos (carne, platos preparados, marisco, queso de pasta blanda), mientras Golsteyn y col. (1991) señalan la posibilidad de detectar hasta 0,1 UFC de *L. monocytogenes* en 1ml ó 1g de alimento (leche pasteurizada y carne picada).

Los inconvenientes de la aplicación de la técnica de PCR a la detección de *L. monocytogenes* en alimentos son fundamentalmente tres: en primer lugar, es una técnica cara, ya que requiere disponer de un equipamiento y unos reactivos de elevado coste; en segundo lugar, el personal que realiza estas pruebas debe estar altamente especializado, pues requiere un manejo muy cuidadoso de las muestras para que el resultado sea fiable; y, por último, es una técnica que detecta la presencia de ADN específico, sin diferenciar el ADN procedente de las bacterias muertas.

I.D.2. Métodos microbiológicos clásicos

A continuación vamos a hacer un resumen de lo que, a lo largo del tiempo ha sido la metodología empleada tradicionalmente para la detección y el aislamiento de

L. monocytogenes a partir de muestras en las que se hallaba presente otra flora microbiana distinta del género *Listeria*, como es el caso de los alimentos. Hay que señalar que esta metodología "tradicional" o "clásica" se sigue empleando actualmente en los laboratorios de análisis de alimentos ya que, por el momento, las limitaciones de las "nuevas técnicas" no permiten su utilización como métodos de rutina en las industrias alimentarias.

I.D.2.a. Técnicas de enriquecimiento

Hasta hace poco tiempo, cuando el desarrollo de los medios altamente selectivos para *Listeria* ha permitido el aislamiento directo de estas bacterias a partir de muestras con gran carga natural de microorganismos, era necesaria una fase previa de enriquecimiento antes de pasar a su aislamiento sobre un medio sólido. La fase de enriquecimiento se utilizaba para incrementar el número relativo de listerias de la muestra, exponiendo ésta a una serie de condiciones o agentes selectivos que impidieran el crecimiento de otros microorganismos y permitiera el desarrollo de las listerias. Aún hoy en día, debido al escaso número de listerias presentes en la mayoría de las muestras, y a pesar de la gran selectividad de los medios para *Listeria*, se siguen empleando las técnicas de enriquecimiento paralelamente al aislamiento directo.

I.D.2.a.1. Enriquecimiento en frío

Un método clásico para el aislamiento de microorganismos del género *Listeria* a partir de cualquier tipo de muestras era el enriquecimiento en frío, que requería la incubación de las muestras a 4°C en un medio no selectivo durante un periodo que variaba desde unos días hasta varias semanas (Gray y col., 1948). Esta técnica está basada en el carácter psicrófilo de las listerias, que crecen a temperaturas de refrigeración, a la vez que se impide el desarrollo de la mayoría del resto de los microorganismos de la muestra. Su principal inconveniente es el largo tiempo que requiere la incubación de las muestras, debiendo realizarse los cultivos en un medio sólido (selectivo o general) al menos una vez a la semana. Esto es debido a que las listerias son bacterias de carácter mesófilo, por lo que su crecimiento a 4°C es lento (tiempo de generación de 1,5 días).

Otros autores también se han basado en la capacidad de las listerias para desarrollarse a temperaturas inferiores a la de la mayoría de los microorganismos mesófilos para desarrollar métodos de enriquecimiento para *Listeria*. Así, Kampelmacher y Van Noorle Jansen (1969) emplearon el medio de transporte de Stuart y la incubación a 21°C durante 7 días para el aislamiento de *Listeria* a partir de muestras de leche. Welshimer (1981) utilizó el mismo sistema como primera etapa de una técnica de enriquecimiento en dos fases a partir de muestras tisulares de animales sospechosos de haber padecido listeriosis, cuya segunda etapa consistía en una incubación a 4°C hasta 6 meses en un caldo nutritivo (Tabla 1.4.).

1.D.2.a.2 Enriquecimiento selectivo

Para evitar el largo periodo de incubación de las muestras que precisaba el enriquecimiento en frío, las investigaciones de muchos autores se han dirigido hacia el diseño de una serie de medios de enriquecimiento en cuya formulación se incluyen diversos agentes selectivos para *Listeria*. Estos medios han permitido que el tiempo de incubación de las muestras se reduzca considerablemente, siendo necesario en muchos casos únicamente de 24 a 48 horas para obtener resultados positivos, aunque en el caso de resultar negativo el análisis, la mayoría de los autores recomiendan continuar la incubación de la muestra al menos durante una semana.

Como agentes selectivos para la formulación de estos medios de enriquecimiento para *Listeria* se han empleado gran variedad de compuestos químicos y antibióticos y, en general, son básicamente los mismos que los utilizados en los medios de aislamiento (Tabla 1.4).

El ácido nalidíxico ha sido el compuesto selectivo más utilizado en gran número de formulaciones. Beerens y Tahon-Castel (1966) utilizaron por vez primera este producto como agente selectivo para bacterias gram positivas (*Listeria*, *Streptococcus* y *Erysipelothrix*), observando que el ácido nalidíxico inhibía el crecimiento de la mayoría de las bacterias gram negativas, así como de muchos hongos. A partir de este dato, muchos investigadores han empleado este producto en sus formulaciones, bien solo o en combinación con otros agentes selectivos. Entre los productos más utilizados en unión al

Tabla I.4. Principales métodos de enriquecimiento para *Listeria*

MEDIO BASE	AGENTES SELECTIVOS	INCUBACION (TEMP/TIEMPO)	REFERENCIA
Caldo nutritivo	Ninguno	4°C / semanas o meses	Gray y col., 1948
Medio de transporte de Stuart	Ninguno	21°C / 7 días	Kampelmacher y Van Noorle Jansen, 1969
Caldo Todd-Hewitt	Dicromato potásico Trióxido de cromo Tionina Acido nalidíxico Antofotericina B	30°C / 24-48 horas	Mavrothalassitis, 1977
Medio de transporte de Stuart Caldo triptosa fosfato	Ninguno	22°C / 7 días 4°C / 6 meses	Welshimer, 1981
Caldo nutritivo Caldo nutritivo + Tween 80	Ninguno Tiocianato potásico + Acido nalidíxico	4°C / 7 días 37°C / siembra diaria	Watkins y Sleath, 1981
Caldo nutritivo	Tiocianato potásico	4°C / 4 días 37°C / 48 horas	Collins y Lyne, 1984
Peptonas + Lab-Lemco	Acido nalidíxico Polimixina B Azul tripán	4°C / 24 horas 22°C / 2-5 días	Domínguez y col., 1984
Caldo tripticaseína-soja + extracto de levadura	Acido nalidíxico	30°C / 24-48 horas	Lovett y col., 1985
Caldo nutritivo + buffer MOPS	Tiocianato potásico + Acido nalidíxico	4°C / 7-28 días 35°C / 24 horas	Hayes y col., 1986
Caldo nutritivo + tween 80	Tiocianato potásico Acido nalidíxico Acriflavina	37°C / 18-24 horas	Fenlon, 1986
Peptonas + Lab-Lemco	Acido nalidíxico Acriflavina	37°C / 24 horas	Donnelly y Baigent, 1986
Peptonas + Lab-Lemco + extracto de levadura	Acido nalidíxico Acriflavina	30°C / 24 horas	Lee y McClain, 1986
Caldo triptosa + sangre	Polimixina B Acido nalidíxico Acriflavina	37°C / 24 horas Microaerobiosis	Doyle y Schoeni, 1986
Caldo tripticaseína-soja + extracto de levadura	Acido nalidíxico Acriflavina Cicloheximida	30°C / 7 días	Lovett y col., 1987
Peptonas + Lab-Lemco	Acido nalidíxico Acriflavina Cloruro de litio	30°C / 24 horas 35°C / 24 horas	Fraser y Sperber, 1988
Peptonas + extracto de levadura	Acriflavina Polimixina B Ceftazidima Cloruro de litio	30°C / 24-48 horas	Van Netten y col., 1989

ácido nalidíxico se encuentra el tiocianato potásico. Este fue empleado con éxito por Watkins y Sleath (1981) en la segunda fase de su técnica de enriquecimiento en dos etapas para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de aguas residuales, y posteriormente ha sido utilizado por otros autores (Tabla 1.4).

Otro compuesto selectivo utilizado a menudo, fundamentalmente en combinación con el ácido nalidíxico es la acriflavina. Esta tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los cocos gram positivos, por lo que su empleo junto con un inhibidor de las bacterias gram negativas, como es el ácido nalidíxico, ofrece unos resultados bastante satisfactorios. Así, han sido numerosos los investigadores que han empleado esta combinación en la formulación de medios selectivos (tanto de enriquecimiento como de aislamiento) para *Listeria*, bien como únicos agentes selectivos (Donnelly y Baigent, 1986; Lee y McClain, 1986) o adicionando algún otro producto que potencia o completa su acción selectiva (Doyle y Schoeni, 1986; Lovett y col., 1987; Fraser y Sperber, 1988).

Doyle y Schoeni (1986) añadieron a la combinación ácido nalidíxico- acriflavina la polimixina B en la formulación de su medio de enriquecimiento que, junto con la incubación en un ambiente de microaerobiosis (lo que dificulta el crecimiento de los microorganismos aerobios estrictos), resulta bastante selectivo para *Listeria*. Donnelly y Baigent (1986) modificaron el medio que habían desarrollado Domínguez y col. (1984), que incluía ácido nalidíxico, polimixina B y azul tripán como agentes selectivos, sustituyendo el azul tripán por la acriflavina y eliminando la glucosa y el citrato amónico férrico; este medio fue denominado UVM. Posteriormente, Lee y McClain (1986) utilizaron el caldo UVM como base de un protocolo de enriquecimiento en dos fases, en el que el segundo medio contenía doble cantidad de acriflavina que el primero. Sin embargo, Buchanan (1990) señala la escasa eficacia de este método, debido a que es de esperar que los microorganismos no deseables que crezcan en el primer medio crezcan también en el segundo y, por tanto, también en el medio de aislamiento que incorporase acriflavina como agente selectivo, por lo que recomienda la utilización de diferentes agentes selectivos en cada fase de enriquecimiento y aislamiento con el fin de optimizar el proceso selectivo. En 1987, Lovett y col. desarrollaron el medio de enriquecimiento utilizado oficialmente por la FDA: el medio LEB incorpora, además del ácido nalidíxico y la acriflavina, un agente inhibidor del crecimiento de los hongos saprofitos, la ciclohexímida.

I.D.2.a.3. Medios diferenciales

Los primeros autores en incorporar agentes diferenciales a los medios de enriquecimiento fueron Domínguez y col. (1984), cuyo medio de enriquecimiento incluía dos agentes diferenciales: por una parte, el azul tripán (que a la vez actuaba como agente selectivo) era reducido por las listerias presentes en la muestra, desapareciendo el color azul del medio; además éste contenía esculina, que al ser hidrolizada por el microorganismo, la esculetina resultante forma un precipitado negro al reaccionar con las sales de hierro presentes en el medio. De esta forma, un aclaramiento del medio, junto con la presencia de un precipitado negro en el medio de enriquecimiento inoculado con una muestra, indicaban la posible presencia de listerias en la muestra, y por tanto sólo había que realizar la siembra en el medio de aislamiento a partir de estas muestras positivas. Posteriormente han sido varios los autores que han empleado la esculina en la formulación de sus medios de enriquecimiento para *Listeria* (Lee y McClain, 1986; Truscott y McNab, 1988).

Fraser y Sperber (1988) utilizaron un método de enriquecimiento en dos fases, que denominaron FEB, en el que tras un enriquecimiento inicial de 24 horas en UVM se transferían las muestras a un caldo UVM modificado que incluía cloruro de litio (que facilita la inhibición del crecimiento de enterococos) y citrato amónico férrico. Las muestras se incubaban en este caldo durante 24 horas y se observaba la presencia del precipitado negro indicativo de la utilización de la esculina. Estos autores indicaron que con esta técnica no aparecían falsos negativos cuando se empleaba para el análisis de gran número de muestras de productos lácteos y muestras ambientales.

I.D.2.b. Métodos de aislamiento

Hasta hace relativamente poco tiempo, el aislamiento era la segunda fase del análisis microbiológico, inmediatamente después del proceso de enriquecimiento. Así, una vez incrementada la cantidad relativa de listerias presentes en la muestra, se procedía a la siembra a partir del caldo de enriquecimiento en un medio de aislamiento selectivo. Como se ha mencionado antes, y debido a la gran selectividad de los medios de cultivo para *Listeria* diseñados en los últimos años, actualmente es posible el aislamiento directo

de listerias a partir de muestras con gran carga de microflora natural aunque, debido al escaso número de listerias en la mayoría de las muestras, se sigue empleando el enriquecimiento en paralelo con el aislamiento directo.

I.D.2.b.1. Medios selectivos

Desde los primeros intentos por desarrollar un medio de cultivo selectivo que permitiera el aislamiento de las listerias presentes en una muestra contaminada naturalmente por otro tipo de microorganismos, han sido muchos los investigadores que se han centrado en este tema y, por tanto, se han desarrollado numerosos medios (Tabla I.5). La mayoría de ellos, sin embargo, presentan cierto grado de inhibición para las listerias y permiten el crecimiento de algún otro tipo de microorganismos, aunque los medios diseñados en los últimos años muestran una alta selectividad a la vez que una escasa inhibición sobre el crecimiento de *Listeria*.

Un medio que ha servido como base para gran número de formulaciones ha sido el MLA (McBride y Girard, 1960). Este medio incorporaba feniletanol, cloruro de litio (que inhiben el crecimiento de las bacterias gram negativas, pero permiten el crecimiento de estafilococos y estreptococos) y glicina como agentes selectivos, y sangre de carnero para diferenciar las colonias hemolíticas. Por otra parte, Leighton (1979) observó que el cloruro de litio tenía un cierto efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, y Lee y McClain (1986) vieron que lo mismo sucedía con la glicina. Además, Smith y Archer (1988) observaron que el feniletanol parece inhibir la reparación de las células bacterianas dañadas subletalmente por el calor.

Lee y McClain (1986) combinaron las mejores características del MLA y el medio de Baird-Parker para crear el medio LPM. Este medio es muy similar en su composición al MLA, excepto que no lleva sangre, incrementa la proporción de cloruro de litio y sustituye la glicina por glicina anhidrida. Curiosamente, el empleo de la glicina anhidrida en el lugar de la glicina fue mencionado por primera vez por Beams y Girard (1959) antes de la publicación del trabajo de McBride y Girard (1960), señalando que la glicina anhidrida mejoraba la selectividad del medio a la vez que resultaba menos inhibitoria para las listerias. Además, el medio LPM lleva un antibiótico β -lactámico, el moxalactamo amónico, que mejora bastante su selectividad. A pesar de que algunos

TABLA I.5. PRINCIPALES MEDIOS SELECTIVOS PARA *Listeria*

MEDIO BASE	AGENTES SELECTIVOS	REFERENCIA
Agar sangre de carnero	Guanofuracina Telurito potásico	Shimizu y col., 1954
Feniletanol agar	Cloruro de litio Glicina	McBride y Girard, 1960
Agar extracto de carne	Telurito potásico Cloramfenicol	Kampelmacher y Van Noorle Jansen, 1961
Agar sangre de caballo	Acido nalidixico	Beerens y Tahon-Castel, 1966
Agar sangre de carnero	Acetato de talio	Kramer y Jones, 1969
Peptona, extracto de levadura, suero bovino	Acido nalidixico Acriflavina	Ralovich y col., 1971
Agar triptosa + dextrosa	Acido nalidixico Acriflavina	Ortel, 1972
Agar tripticaseína-soja	Acido nalidixico Pironina Gallocianina	Navrothalassitis, 1977
BHI o Agar Columbia + eritrocitos de carnero	Acido nalidixico Acriflavina	Skaika y Smola, 1983
Peptonas + sangre de carnero	Acido nalidixico Acriflavina	Domínguez y col., 1984
Agar sangre	Acido nalidixico Acriflavina	Fenlon, 1985
Feniletanol agar	Cloruro de litio Glicina anhidrida Moxalactamo amónico	Lee y McClain, 1986
Feniletanol agar	Cloruro de litio Glicina Acido nalidixico Moxalactamo amónico Bacitracina Telurito potásico	Buchanan y col., 1987
Feniletanol agar	Cloruro de litio Glicina anhidrida	Lovett y col., 1987
Agar tripticaseína-soja	Acriflavina Ceftazidima	Bannerman y Bille, 1988
BHI + peptonas	Acido nalidixico Acriflavina Polimixina B Azul de metileno	Van Netten y col., 1989
Agar Columbia	Cloruro de litio Polimixina B Ceftazidima Acriflavina	Golden y col., 1988
Agar Columbia	Cloruro de litio Fosfomicina Acriflavina Cefotetán Colistina sulfato Cicloheximida	Curtis y col., 1989
BHI agar	Cloruro de litio Ceftazidima Acriflavina Polimixina B Telurito potásico	Blanco y col., 1989
Columbia agar base	Cloruro de litio Colistina sulfato Moxalactamo amónico	McClain y Lee, 1989

autores encuentran este medio algo más inhibitorio para las listerias que el MLA (Swaminathan y col., 1988), los resultados obtenidos con él son en conjunto mejores, y es el medio que utiliza actualmente el USDA (United States Department of Agriculture) para la detección de *L. monocytogenes*.

En 1987, Lovett y col. modificaron el MLA mediante la eliminación de la sangre, la adición de cicloheximida para eliminar el crecimiento fúngico, y la sustitución de la glicina por glicina anhidrida. El medio resultante, MMA (McBride Modified Agar), es el que emplea actualmente la FDA (United States Food and Drug Administration). Buchanan y col. (1987), a su vez, modificaron el MMA mediante la adición de ácido nalidíxico, moxalactamo y bacitracina. Este medio, conocido como ARS-MMA presentaba un mejor comportamiento que los anteriores medios de su mismo tipo; sin embargo, estudios realizados por Cassidy y Brackett (1989) revelaron que el ARS-MMA no recuperaba bien las células de *L. monocytogenes* inoculada en ciertos alimentos (leche pasteurizada, helado, col y cierto tipo de quesos), principalmente si las bacterias habían sido dañadas previamente por algún tratamiento del alimento.

Muchos autores han incorporado a los medios de aislamiento para *Listeria* ácido nalidíxico y/o acriflavina como agentes selectivos, solos o en combinación con otros agentes que incrementan la selectividad (Tabla 2). Beerens y Tahon-Castel (1966) fueron los primeros autores en recomendar la utilización del ácido nalidíxico en un medio de aislamiento selectivo para *Listeria*. Posteriormente, Kramer y Jones (1969) lo combinaron con acetato de talio, señalando el efecto inhibitorio de esta combinación sobre el crecimiento de las bacterias gram negativas y los hongos. Mavrothalassitis (1977) desarrolló un medio de aislamiento que incorporaba ácido nalidíxico, gallocianina y pironina como agentes selectivos. Más recientemente, Buchanan y col. (1987) encontraron que la combinación del ácido nalidíxico con moxalactamo amónico y bacitracina inhibía gran parte de la flora contaminante de los alimentos. Sin embargo, y al igual que ocurría con los medios de enriquecimiento, la combinación más empleada ha sido la del ácido nalidíxico como inhibidor de bacterias gram negativas con la acriflavina como inhibidora de cocos gram positivos.

Entre los diversos antibióticos empleados en los últimos años en la formulación de medios selectivos para *Listeria* figuran dos cefalosporinas: el moxalactamo amónico (Lee

y McClain, 1986; Buchanan y col., 1987; McClain y Lee, 1989) y la ceftazidima (Bannerman y Bille, 1988; Van Netten y col., 1989; Blanco y col., 1989; Lachica, 1990). La combinación de estos antibióticos con otros agentes selectivos (acriflavina, bacitracina, colistina sulfato, fosfomicina, polimixina B, cloruro de litio, telurito potásico, glicina) han mejorado notablemente la selectividad de los medios de cultivo para *Listeria*.

I.D.2.b.2. Diferenciación de las colonias de *Listeria*. Técnica de Henry

La identificación de las colonias de *Listeria* según la técnica descrita por Henry en 1933 y recomendada por Gray y col. (1950) se basa en el color azul grisáceo que muestran cuando las placas se iluminan con luz reflejada oblícua. Este método se ha utilizado con gran número de medios de cultivo para diferenciar las colonias de *Listeria* de las formadas por otros microorganismos (Ralovich y col., 1971, Mavrothalassitis, 1977, Martin y col., 1984, Lee y McClain, 1986, Lovett y col., 1987). Sin embargo, el principal inconveniente de esta técnica es que el medio de cultivo ha de ser transparente, por lo que no puede incorporar productos selectivos (acriflavina, colorantes) o diferenciales (citrato amónico férrico, sangre) que le proporcionen algún tipo de color. Además, Hao y col. (1987) han señalado que este método no era válido para detectar la presencia de *Listeria* a partir de algunos alimentos, como la col, debido a que algunos de los microorganismos naturales de este alimento forman colonias de un color similar a las de *Listeria*.

I.D.2.b.3. Medios selectivos diferenciales

A pesar de que la técnica de Henry se ha venido utilizando comúnmente para la diferenciación de las colonias de *Listeria*, esta técnica tiende a la subjetividad y no es útil para el análisis cuantitativo. Por este motivo, diversos investigadores han trabajado en el desarrollo de medios de aislamiento que se basen en otros criterios de diferenciación.

Gray y col. (1950) emplearon el telurito potásico como agente selectivo y diferencial para *Listeria*, ya que inhibía el crecimiento de las bacterias gram negativas permitiendo, no obstante, el de las bacterias gram positivas. Las colonias de *Listeria* se distinguían por sus centros negros (debido a la reducción del telurito) y bordes de color azul-verdoso

característico cuando se observaban según la técnica de Henry (1933), con lo que la diferenciación presuntiva de *Listeria* resultaba relativamente fácil si el número relativo de microorganismos competidores era bajo. A pesar de que algunos autores señalan que el telurito potásico puede ejercer algún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de algunas cepas de *Listeria* (Seeliger, 1961), así como sobre la reparación de células dañadas subletalmente por el calor (Smith y Archer, 1988), ha sido utilizado como agente selectivo y diferencial posteriormente en varias formulaciones, tanto solo como en combinación con otros inhibidores (Shimizu y col., 1954; Kampelmacher y Van Noorle Jansen, 1961; Buchanan y col., 1987; Blanco y col., 1989).

Domínguez y col. (1984) utilizaron la capacidad de las listerias para hidrolizar la esculina en un medio cuyos agentes selectivos eran el ácido nalidíxico y la acriflavina (LSAM). Las colonias de *Listeria* podían ser diferenciadas con relativa facilidad del resto de los contaminantes gracias al oscurecimiento del medio que se producía alrededor de las colonias al hidrolizar la esculina en presencia de citrato amónico férrico. Esta prueba ha sido empleada posteriormente en la formulación de diversos medios selectivos para *Listeria*, principalmente en los desarrollados últimamente (Van Netten y col., 1989; Curtis y col., 1989; McClain y Lee, 1989). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la capacidad para hidrolizar la esculina no es una característica específica del género *Listeria*, ya que existen otras bacterias que poseen este carácter, (p.e. algunos enterococos). Por ello, y a pesar de la gran selectividad de los medios desarrollados en los últimos años, no se puede afirmar que todas las colonias esculina-positivas presentes en un medio selectivo pertenezcan al género *Listeria*. El medio de Domínguez y col. (1984) ha sido posteriormente mejorado (LSAMm) mediante la incorporación en su fórmula de nuevos agentes selectivos e indicadores (polimixina B, ceftazidima, telurito potásico), que aumentan tanto su selectividad como su facilidad para identificar las posibles colonias de listerias que en él crezcan (Blanco y col., 1989).

McDonald y col. (1988), estudiando el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de quesos fermentados, modificaron el pH del medio MMA y le incorporaron lactosa más azul de bromotimol como indicador de pH. De este modo, las colonias de *Listeria* (lactosa-negativo) aparecían en el medio de un color azul-verdoso, mientras que las colonias de los enterococos lactosa-positivo eran de color amarillo-naranja. Sin embargo, esta diferenciación no parece ser muy efectiva, ya que en la última edición del Manual

Bergey, Seeliger y Jones indican que algunas cepas de *Listeria* pueden utilizar la lactosa.

El medio de cultivo diseñado por Van Netten y col. (1989) (PALCAM) contiene como agentes diferenciales además de la combinación esculina/citrato amónico férrico, otro hidrato de carbono, el manitol, junto con el rojo fenol como indicador de pH. Esta formulación se basa en que todas las especies del género *Listeria* son manitol-negativo, mientras que la mayoría de los enterococos son manitol-positivo. De esta forma, sobre el medio de color rojo, las colonias de *Listeria* aparecen rodeadas por un halo oscuro (reacción positiva a la esculina), mientras alrededor de las colonias de los enterococos el color del medio se toma amarillo (manitol-positivo). Estos autores señalan que esta diferenciación es efectiva siempre que las colonias de bacterias manitol-positivo no sean tan numerosas que enmascaren las manitol-negativo.

I.D.2.c. Diferenciación de las especies de *Listeria* por su capacidad hemolítica

Con el fin de diferenciar las colonias de listerias hemolíticas de las no hemolíticas, muchos de los medios para *Listeria* llevan en su composición sangre o eritrocitos de camero o caballo (Tabla 1.5). Es importante determinar el carácter hemolítico de las listerias halladas en una muestra para establecer correctamente su papel en la epidemiología de la listeriosis, ya que únicamente las listerias hemolíticas son consideradas patógenas (como se ha indicado en el apartado I.A.3. De las especies incluídas en el género *Listeria*, sólo dos son patógenas para el hombre y los animales: *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. *L. seeligeri*, aunque es débilmente hemolítica, es considerada no patógena, y el resto de las especies son no hemolíticas y, por tanto, no patógenas. Por otro lado, las especies aisladas con mayor frecuencia a partir de los alimentos son *L. monocytogenes* y *L. innocua*, que se pueden diferenciar fácilmente ya que, como se ha mencionado antes, la primera es hemolítica. Así, cabe decir que *L. monocytogenes* es la principal especie patógena aislada de los alimentos destinados al consumo tanto humano como animal.

Sin embargo, la interpretación de la hemólisis de las colonias de *Listeria* en agar sangre es dificultosa; por ejemplo, en el caso de *L. monocytogenes*, la hemólisis que produce es de intensidad variable dependiendo del origen de la sangre, de la cepa, e

incluso de si ésta ha sido sometida a condiciones estresantes que puedan afectar a su capacidad hemolítica (Skalka y col., 1982). Así, algunas cepas producen halos de hemólisis muy discretos que pueden pasar desapercibidos o ser confundidos con los producidos por *L. seeligeri*. Además, hay que tener en cuenta que en un medio selectivo, los agentes inhibidores que contiene también pueden afectar al efecto hemolítico producido por una misma cepa, bien disminuyéndolo, o bien potenciándolo (Fernández-Garayzábal y col., 1992b). Por otro lado, cepas de *L. innocua* pueden mostrar falsas hemólisis positivas cuando crecen en agar sangre con glucosa (Skalka y col., 1983).

Con el fin de diferenciar mejor la capacidad hemolítica de las distintas especies de *Listeria*, Skalka y Smola (1983) incorporaron a un medio selectivo, cuya base contenía eritrocitos de carnero, un sobrenadante del cultivo de *Rhodococcus equi*, que incrementaba específicamente la actividad hemolítica de *L. ivanovii* y que ellos señalaron que también incrementaba la detección de cepas de *L. monocytogenes* poco hemolíticas.

La mayoría de los investigadores que estudian este tema han comprobado que la incorporación de la sangre al medio selectivo no proporciona excesivas ventajas sobre los medios carentes de sangre, por lo que los medios selectivos desarrollados en los últimos años no llevan sangre en su fórmula. Cuando se emplean estos medios, la identificación de las listerias hemolíticas/ patógenas se realiza resemebrando en agar sangre un determinado número de colonias que presenten en el medio la morfología típica de *Listeria*. Este sistema, sin embargo, presenta dos inconvenientes: por una parte, la dificultad de la interpretación de la hemólisis de *Listeria* en agar sangre, y por otra la posibilidad de que la presencia de un escaso número de listerias hemolíticas queden enmascaradas en una muestra altamente contaminada por listerias no hemolíticas, donde sólo un escaso número de colonias se resiembran para su posterior identificación.

Con el fin de evitar estos inconvenientes, Domínguez y col. (1990) han desarrollado una técnica bifásica para la detección de listerias hemolíticas directamente sobre un medio selectivo. Este método consiste en la adición, directamente sobre el medio selectivo donde existan colonias sospechosas de ser *Listeria*, de una capa de agar-eritrocitos de carnero, la cual proporciona la información sobre la capacidad hemolítica de las colonias sospechosas previamente enumeradas. El empleo de esta técnica, en combinación con un medio altamente selectivo como es el LSAMm (Blanco y col., 1989), permite la

enumeración específica de listerias hemolíticas/patógenas a partir de muestras altamente contaminadas por otros microorganismos, aunque el número de listerias hemolíticas sea muy reducido.

I.D.2.d. Técnicas de enumeración

La determinación del número de listerias presentes en una muestra es importante por dos motivos fundamentales: además de indicar su grado de contaminación por estas bacterias, en el caso de los alimentos (tanto los destinados al consumo humano como animal), cobra mayor relevancia, ya que, como hemos comentado anteriormente (apartado II), el desencadenamiento de un caso clínico depende del estado del hospedador y de la dosis de listerias patógenas. Por tanto, dependiendo de la población a que vaya destinada un alimento, podrán ser permisibles unos niveles u otros de contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes* (Esquema I.1).

En este sentido, Watkins y Sleath (1981) emplearon una técnica del Número Más Probable (NMP) con un caldo y un medio de cultivo selectivos para la enumeración de *L. monocytogenes* a partir de muestras de aguas residuales y agua de río, y Fenlon (1986) también utilizó un método similar para la enumeración de listerias a partir de un ensilado implicado en un brote de listeriosis en ganado ovino. Estos métodos, aunque de fácil realización, sin embargo son laboriosos y requieren cierto tiempo de incubación de las muestras.

El sistema más empleado, fundamentalmente en los últimos años, en que el desarrollo de los medios selectivos para *Listeria* ha experimentado una gran mejora, es la siembra directa a partir de diluciones decimales de la muestra sobre un medio selectivo. Mediante este método, y debido a la gran selectividad de los medios formulados últimamente, es posible efectuar la enumeración de las listerias presentes en una muestra altamente contaminada con otros microorganismos incluso aunque el número de listerias sea escaso.

I.D.2.e. Detección de *L. monocytogenes* dañada subletalmente por congelación

En general, han sido muchas las técnicas desarrolladas para incrementar la reparación de las bacterias tras su congelación (Ray, 1986; van Schothorst, 1976; Oscroft y col., 1987). Sin embargo, no hay un acuerdo sobre las condiciones óptimas para recuperar determinados microorganismos en estas condiciones, habiéndose empleado con cierto éxito tanto medios ricos como medios mínimos (van Schothorst, 1976).

En el caso de *L. monocytogenes*, hay que decir que no han sido muchos los investigadores que se hayan propuesto diseñar un método adecuado para la recuperación de las células de *L. monocytogenes* lesionadas por congelación, debido fundamentalmente a la dificultad que ha existido hasta hace pocos años para detectar incluso *L. monocytogenes* no dañada, y a que la mayoría de los estudios sobre *L. monocytogenes* lesionadas se han realizado con bacterias a las que se aplicó un tratamiento térmico subletal.

Se ha evaluado el comportamiento de algunas técnicas de enriquecimiento para la recuperación de *L. monocytogenes* tras un proceso de congelación / descongelación, empleando diversos alimentos naturalmente contaminados o inoculados con *L. monocytogenes* (Noah y col., 1991; Lovett y col., 1991; Walker y col., 1991; Warburton y col., 1992). Los medios de enriquecimiento empleados en estos estudios han sido fundamentalmente el LEB de la FDA (Lovett y col., 1987) y el UVM de la USDA (Donnelly y Baigent, 1986), señalando en un amplio estudio comparativo de los dos medios que ambos mostraron similar capacidad para la detección de *L. monocytogenes* lesionadas subletalmente tanto por congelación como por calor (Warburton y col., 1992).

Otros autores señalan, por el contrario, la necesidad de una primera incubación en un medio no selectivo que permita la recuperación de las células lesionadas, seguida de un proceso de enriquecimiento selectivo (Varabioff, 1990; McCarthy y col., 1990; Budu-Amoako y col., 1992; Martin y Katz, 1993; Yu y Fung, 1993). Así, se ha empleado el enriquecimiento en frío de las muestras en un caldo nutritivo como una primera etapa de enriquecimiento en dos pasos, consistiendo el segundo de ellos en la incubación a 30°C en caldo selectivo (LEB o UVM) (Varabiof, 1990; McCarthy y col., 1990). Estos métodos, aunque son eficaces, presentan el inconveniente de que requieren mayor tiempo de

incubación (de 3 a 7 días). Son, por tanto, más efectivas las técnicas que emplean la incubación a una temperatura óptima para el crecimiento de *L. monocytogenes* (35°C) en un caldo no selectivo durante el tiempo necesario para la recuperación de las células dañadas (4-6 horas), añadiendo después a este mismo caldo los agentes selectivos empleados habitualmente (ácido nalidíxico, acriflavina, etc.) (Martin y Katz, 1993; Budu-Amoako y col., 1992).

OBJETIVOS

Las epidemias de listeriosis ocasionadas por el consumo de alimentos han incrementado el estudio de la incidencia de *L. monocytogenes* en diversos tipos de alimentos, entre ellos, los alimentos precocinados. La presencia de *L. monocytogenes* en este tipo de productos podría ser el resultado de temperaturas inadecuadas de cocinado, prácticas de manipulación deficientes, o la recontaminación tras el cocinado antes del envasado de los productos.

Por otro lado, se sabe que *L. monocytogenes* es capaz de crecer en una gran cantidad de productos precocinados durante su almacenamiento en refrigeración, por lo que el interés de la industria alimentaria se dirige actualmente hacia el estudio de la capacidad de las células de *Listeria* dañadas subletalmente para repararse a temperaturas de refrigeración. En este sentido, todavía no se conoce exactamente el peligro que puede representar la presencia de bajas cantidades de *L. monocytogenes* dañadas subletalmente, pero viables, en alimentos precocinados. Estos productos podrían contener una cantidad de *L. monocytogenes* inferior al límite de detección de los métodos empleados actualmente.

A este respecto, hay que señalar que los procedimientos que emplean medios de enriquecimiento y aislamiento altamente selectivos para facilitar el crecimiento de *Listeria* entre otros microorganismos, no parecen ser útiles para la recuperación de las listerias dañadas subletalmente que podrían estar presentes en este tipo de alimentos, siendo la detección de estas bacterias esencial para asegurar la salud de los consumidores.

Teniendo en cuenta estos factores, los principales objetivos a la hora de plantear nuestro trabajo dentro de la línea de investigación sobre *Listeria* que se lleva a cabo en nuestro Departamento, han sido los siguientes:

1º.- Estudiar algunos de los factores que pueden influir en la viabilidad y el daño subletal celular en *L. monocytogenes* sometida a un tratamiento de congelación/descongelación.

2º.- Definir la utilidad de los medios selectivos de aislamiento para *Listeria* diseñados en los últimos años para la recuperación de listerias dañadas subletalmente por efecto de la

congelación.

3º.- Diseñar un medio líquido en el que las listerias dañadas subletalmente por congelación presentes en una muestra pudieran experimentar una reparación, siendo entonces capaces de crecer en un medio de aislamiento selectivo.

4º.- Comprobar la efectividad del medio de reparación diseñado junto con el medio de aislamiento LSAMm, para la detección de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* a partir de alimentos congelados naturalmente contaminados con listerias.

MATERIAL Y METODOS

III.A. CEPAS DE *Listeria*

Las cepas de *Listeria* que hemos empleado en las distintas partes de nuestra investigación se reflejan en la Tabla III.1. Todas ellas se conservaban en un medio crioprotector a -20°C.

Tabla III.1. Cepas de *Listeria*

Especie	Cepa	Serotipo	Origen
<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 7973	1/2a	Colección
<i>L. monocytogenes</i>	Scott A	4b	Caso clínico
<i>L. monocytogenes</i>	P3	4b	"
<i>L. monocytogenes</i>	P 14b	4b	"
<i>L. monocytogenes</i>	C 1	1/2c	Carne
<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	6a	Colección

III.A.1. Preparación de las suspensiones de *Listeria*

Cada una de las cepas fue descongelada y cultivada en Agar Columbia-sangre (CAS, BioMérieux) (35°C, 24 horas) para comprobar la ausencia de contaminación por otros microorganismos. A partir del crecimiento en CAS se procedió a cultivar cada una de las cepas en caldo infusión de cerebro y corazón (BHI, Difco) en agitación (35°C, 24 horas, 150 r.p.m.). Una vez crecidas se centrifugaron dos veces (800 x g, 15 minutos), realizándose los lavados con tampón fosfato salino 0,1 M y pH 7,0 (PBS) con el fin de eliminar el medio de cultivo.

Tras la segunda centrifugación, las células bacterianas se resuspendieron en PBS

hasta obtener una concentración de aproximadamente 10^9 - 10^{10} bacterias/ml, lo cual se comprobó mediante la realización del primer recuento (R-1): a partir de cada suspensión de las diferentes cepas de *Listeria* se realizaron diluciones decimales en PBS que se sembraron por duplicado (0,1 ml) en BHI agar (BHIA, Difco), el mismo medio suplementado con cloruro sódico al 6% (BHIA-S) y y el medio selectivo para *Listeria* LSAMm (Blanco y col., 1989). Tras la incubación (35°C, 48 horas) se efectuó el recuento de las colonias, comprobando la concentración de la suspensión de cada cepa. Todos los recuentos de las experiencias sucesivas se efectuaron de esta misma manera.

Cada una de las suspensiones de *Listeria* se distribuyó en tubos estériles de poliestireno de 3 ml de capacidad, que fueron almacenados a -80°C hasta su utilización (como máximo 2 meses).

En el momento de su empleo, se descongelaban los tubos necesarios bajo el grifo de agua corriente por un tiempo de aproximadamente 3 minutos y se efectuaba un segundo recuento (R-2). Este se realizaba siguiendo la misma metodología que el R-1, y su finalidad era comprobar que las células bacterianas no habían experimentado ningún cambio durante su almacenamiento.

III.B. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE CONGELACION/DESCONGELACION DE UNA SUSPENSION DE LISTERIAS

Nuestro primer objetivo fue determinar cuáles iban a ser las condiciones de congelación/ descongelación de las suspensiones de *Listeria* que íbamos a emplear, de manera que en las sucesivas experiencias trabajáramos de la manera más homogénea posible. Para ello fijamos tres parámetros: a) la **temperatura** de congelación (-20°C); b) el **volumen** de las suspensiones de *Listeria* (2 ml en tubos de poliestireno de 3 ml de capacidad); y c) el **método de descongelación** (bajo un grifo de agua corriente durante aproximadamente 3 minutos). De esta forma quedaban sin determinar el tiempo de almacenamiento en congelación, el número de congelaciones / descongelaciones y la concentración de bacterias de la suspensión.

III.B.1. Determinación del tiempo de almacenamiento en congelación y número de ciclos de congelación/descongelación

Para averiguar los efectos de distintos tiempos de almacenamiento en congelación, así como los de la aplicación de varios ciclos de congelación/descongelación sucesivas sobre la viabilidad de las suspensiones de *Listeria*, procedimos a descongelar dos tubos de *L. monocytogenes* NCTC 7973 almacenados a -80°C (aproximadamente 10^{10} UFC/ml). Uno de estos tubos se mantuvo a -20°C durante 7 días, mientras el otro se descongeló los días 1, 2 y 3. Tras cada una de las descongelaciones de ambos tubos se efectuaron las siembras a partir de las diluciones decimales adecuadas en BHIA, BHIA-S y LSAMm.

Las condiciones óptimas respecto al tiempo y número de descongelaciones, según nuestros objetivos (conseguir el mayor porcentaje de bacterias lesionadas en el menor tiempo posible), correspondieron a **una descongelación a las 24 horas**, por lo que decidimos seguir esta pauta en el resto de las experiencias.

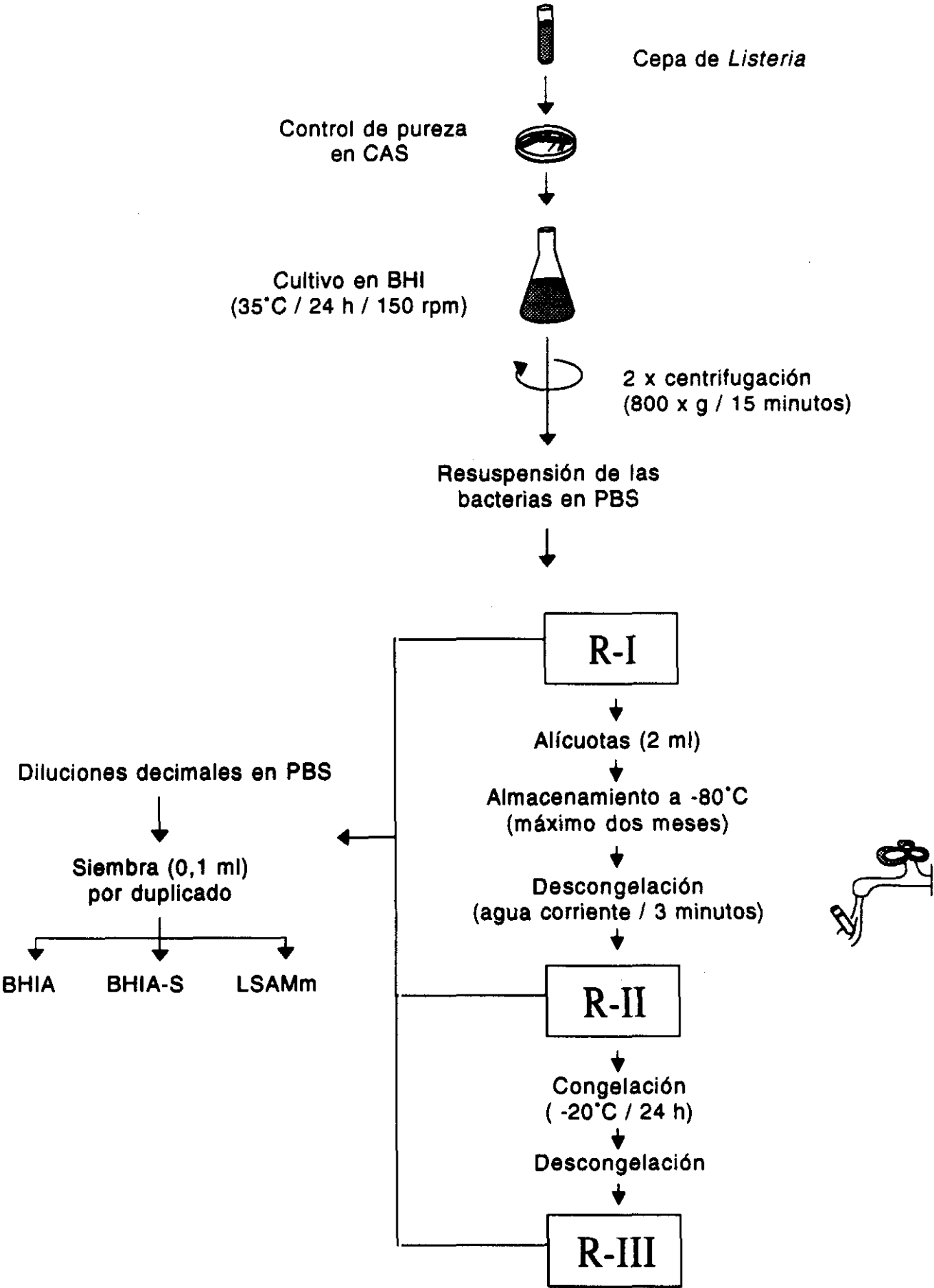
III.B.2. Determinación de la concentración óptima de listerias en la suspensión congelada

A partir de varias suspensiones de *L. monocytogenes* NCTC 7973 y Scott A (10^9 UFC/ml) se realizaron diluciones decimales en PBS hasta una concentración final de 10^4 UFC/ml. A partir de cada una de las diluciones se tomaron 2 ml que fueron congelados y descongelados según hemos descrito anteriormente (-20°C , 24 horas), efectuándose a continuación los recuentos en BHIA, BHIA-S y LSAMm. Las experiencias se agruparon en función de la concentración inicial en la suspensión de listerias, estableciendo tres niveles: concentración alta (10^8 - 10^{10} UFC/ml), media (10^6 - 10^8 UFC/ml) y baja (10^4 - 10^6 UFC/ml).

Los resultados más adecuados para nuestras experiencias se obtuvieron a partir de los recuentos tras descongelar la suspensión con mayor concentración de listerias, por lo que decidimos mantener esta concentración en las sucesivas experiencias (**entre 10^9 y 10^{10} UFC/ml**).

En el Esquema III.1 se representa la metodología empleada para la obtención de

ESQUEMA III.1. PREPARACION DE LAS SUSPENSIONES DE LISTERIAS CONGELADAS (SLC)



las suspensiones de listerias de las que partiríamos para nuestros estudios posteriores. El proceso seguido fue el mismo con todas las cepas y en todos los casos hasta efectuar el R-3, por lo que obviaremos todos estos pasos al describir el resto de las experiencias, refiriéndonos a la suspensión de listerias que ha sufrido este proceso como "suspensión de listerias congeladas" (SLC).

III.B.3. Determinación del porcentaje de listerias dañadas subletalmente tras un tratamiento de congelación / descongelación

En una suspensión de listerias que ha sido sometida a un tratamiento como es la congelación, al cesar éste encontraremos tres tipos de poblaciones: listerias muertas, listerias dañadas subletalmente (LD), y listerias no lesionadas (LS), siendo la totalidad de listerias viables la suma de LD+LS. Para diferenciar los distintos porcentajes de cada población presentes en una suspensión se efectuaba el recuento sobre tres medios sólidos: BHIA (donde crecen todas las bacterias viables), BHIA-S y LSAMm (en estos dos medios sólo crecen las bacterias no lesionadas). El porcentaje de LD de una suspensión se determinaba según la fórmula siguiente:

$$LD (\%) = \left(1 - \frac{\text{Recuentos en BHIA-S o LSAMm}}{\text{Recuentos en BHIA}} \right) \times 100$$

III.C. EFICACIA DE DISTINTOS MEDIOS SELECTIVOS PARA EL AISLAMIENTO DIRECTO DE *Listeria* TRAS SU CONGELACION

El objetivo de esta experiencia fue comprobar la capacidad de cuatro de los medios selectivos más empleados para la detección de *Listeria* para la recuperación de listerias que habían sufrido un proceso de congelación, sin un proceso de reparación previo.

Las **cepas** utilizadas fueron: *L. monocytogenes* NCTC 7973, Scott A y P3, y *L. innocua* ATCC 33090, y los **medios selectivos** para *Listeria* utilizados fueron LSAMm, LPM (Lee y McClain, 1986), PALCAM (Van Netten y col., 1989) y OXFORD (Curtis y col., 1989). Como controles se emplearon BHIA y BHIA-S.

La metodología en cuanto a la preparación de las suspensiones de listerias congeladas se realizó como hemos descrito anteriormente (Esquema III.1). En estas experiencias, la concentración inicial de listerias en la suspensión fue entre 10^5 y 10^8 UFC/ml, efectuándose los recuentos R-2 y R-3 en todos los medios de cultivo anteriormente señalados. Los porcentajes de LD en las distintas SLC se determinaron según la fórmula descrita en el apartado III.B.3.

III.D. REPARACION DE LISTERIAS DAÑADAS SUBLETALMENTE POR CONGELACION EN BHI

En experiencias previas estudiamos la posibilidad de diseñar un medio mínimo líquido a partir de componentes simples (vitaminas, fosfolípidos, azúcares, etc.) para la reparación de las listerias viables pero dañadas tras un proceso de congelación. Sin embargo, los resultados de estas experiencias no fueron mejores que los obtenidos con el medio que empleamos como referencia (BHI), por lo que pensamos que no existía justificación para la formulación de un medio más complicado.

Por este motivo decidimos comprobar la eficacia del BHI para la reparación de listerias que habían sufrido un tratamiento de congelación.

Las **cepas** empleadas en este estudio fueron *L. monocytogenes* NCTC 7973, Scott A y P3, y *L. innocua* ATCC 33090.

El proceso de reparación consistió en la inoculación de 0,5 ml de varias diluciones realizadas a partir de una SLC de cada cepa en 50 ml de BHI. Los matraces con el caldo inoculado se mantuvieron a 30°C durante 24 horas en agitación (150 r.p.m.), efectuándose los recuentos de listerias a las horas 0, 2, 4, 6, 8 y 12 en los medios BHIA, BHIA-S y LSAMm.

III.E. INFLUENCIA DEL CLORURO DE LITIO (CL) EN LA REPARACION Y EL CRECIMIENTO DE *L. monocytogenes* DAÑADA POR CONGELACION

El cloruro de litio (CL) es uno de los agentes selectivos más empleado en la formulación de los medios para *Listeria*, tanto en caldos de enriquecimiento como en medios sólidos de aislamiento (Tablas I.4 y I.5). Con el fin de comprobar la influencia que pudiera tener este agente selectivo sobre la reparación y el crecimiento de las listerias tras su congelación, procedimos a realizar diversas experiencias, que pasamos a describir a continuación.

III.E.1. Efecto del CL sobre el crecimiento de la microflora presente habitualmente en los alimentos

Antes de comprobar la influencia del CL sobre la recuperación de *L. monocytogenes*, procedimos a estudiar su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los microorganismos presentes en los alimentos donde más frecuentemente se ha aislado *L. monocytogenes*. Para ello preparamos un homogeneizado de alimentos que emplearíamos en sucesivas experiencias.

III.E.1.a. Preparacion del homogeneizado de alimentos (HA)

Se emplearon tres tipos de alimentos: leche cruda de vaca, que fue obtenida en una granja cercana al laboratorio y transportada en refrigeración, carne picada de vacuno y queso de pasta dura. La carne y el queso fueron adquiridos en un supermercado cercano y, una vez en el laboratorio, se homogeneizaron con PBS en bolsas estériles en un homogeneizador ("stomacher", IUL) durante 3 minutos aproximadamente. A continuación se hicieron pasar a través de una gasa estéril con el fin de recoger únicamente la parte líquida de los homogeneizados.

Antes de mezclar los homogeneizados de carne y de queso y la leche cruda, se procedió a la determinación de la ausencia de *Listeria* en cada uno de estos. Para ello, a

partir de cada homogeneizado, así como de la leche, se realizó una siembra directa en LSAMm y un enriquecimiento (30°C, 24 horas/7 días) en el medio LEB (Lovett y col., 1987), a partir del cual se efectuó la siembra en LSAMm.

Una vez comprobada la ausencia de *Listeria* spp. en cada alimento, éstos se mezclaron y se almacenaron en alícuotas de 5 ml en tubos de poliestireno a -80°C hasta el momento de su utilización.

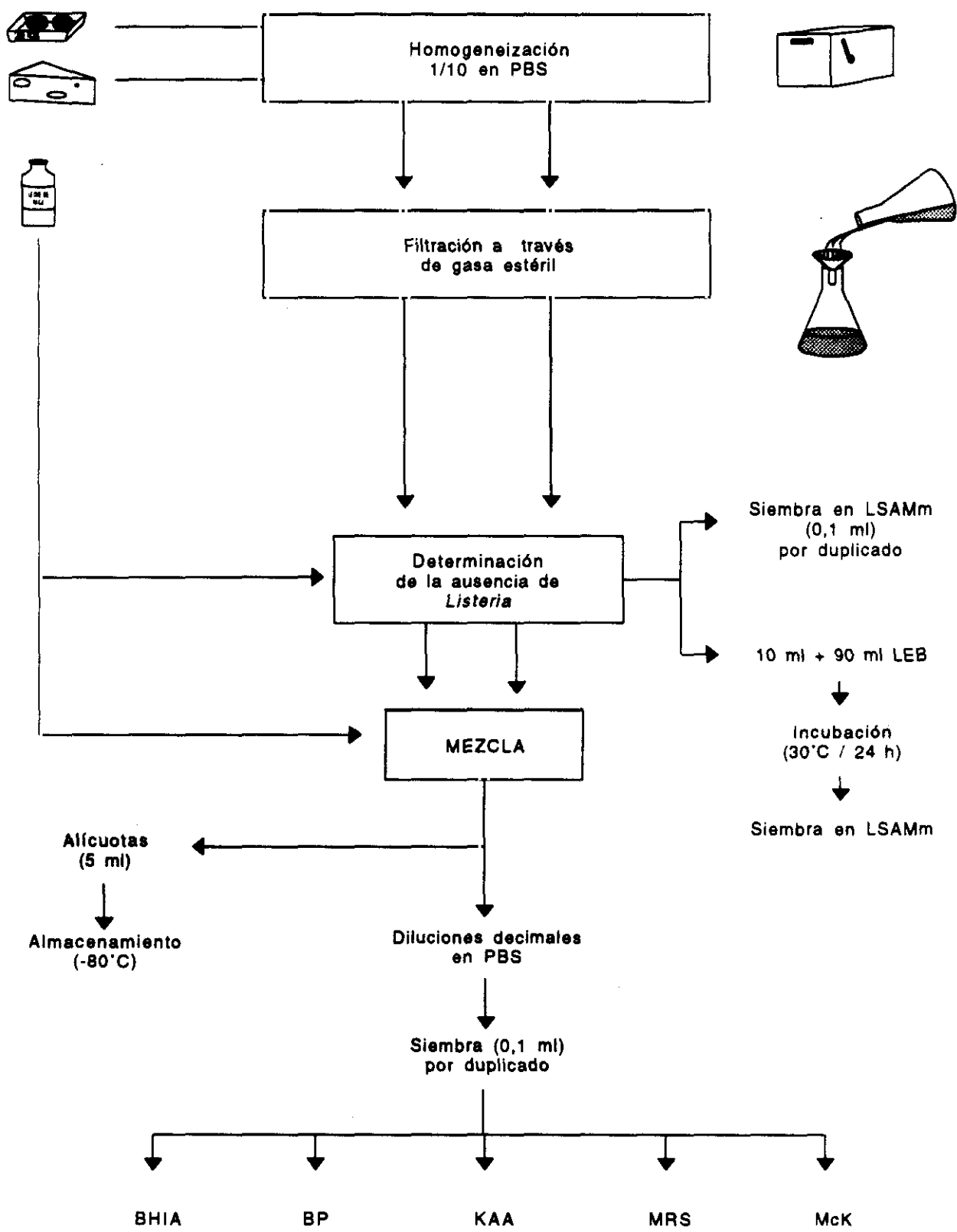
Antes de su almacenamiento, se determinó la **concentración de microorganismos mesófilos totales** del homogeneizado de alimentos (HA), así como el estudio de los **principales grupos de bacterias presentes** mediante el recuento bacteriano en diversos medios de cultivo: BHIA para el recuento de microorganismos totales; medio de Baird-Parker (Merck) para el recuento de estafilococos; agar kanamicina-esculina (KAA, Oxoid) para los estreptococos; agar de Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid) para lactobacilos y pediococos; y agar de MacConkey (McK, Merck) para el recuento de coliformes (Esquema III.2).

III.E.1.b. Influencia del CL sobre el crecimiento de los microorganismos del homogeneizado de alimentos en BHI

A partir de una alícuota del HA almacenada a -80°C y posteriormente descongelada, procedimos a determinar el efecto inhibitorio que ejerce el CL sobre el crecimiento de los microorganismos del HA en BHI. Para ello se realizó un inóculo a partir del HA (0,5 ml, aproximadamente 10^5 UFC/ml de concentración final) en varios matraces con 50 ml de BHI que fueron suplementados con 2,5 ml de una suspensión de CL al 30% en agua destilada (concentración final de CL del 1,5%), a distintos tiempos: a las 0, 4 y 6 horas, manteniendo un matraz que no se suplementó con CL como control. Todos los matraces se llevaron a incubar (30°C, 150 r.p.m.), efectuándose los recuentos de microorganismos mesófilos totales a partir de cada uno de los matraces a las 0, 2, 4, 6 y 24 horas en BHIA.

Con el fin de conocer las diferencias de crecimiento de los distintos grupos de microorganismos presentes en el HA, a partir de los cultivos de estos microorganismos en

ESQUEMA III.2. PREPARACION DEL HOMOGENEIZADO DE ALIMENTOS



BHI suplementado con CL a las 0 horas (BHI-CL), se efectuaron recuentos a las 24 horas de incubación, además de en BHIA, en los diversos medios de cultivo descritos en apartado III.E.1.a

III.E.2. Influencia del momento de la incorporación del CL sobre la reparación de *L. monocytogenes* dañada subletalmente por congelación

Partiendo de varias SLC de *L. monocytogenes* NCTC 7973 se procedió a realizar un proceso de reparación de las LD en BHI según la metodología indicada en el apartado III.D. Cada uno de los matraces procesados fue suplementado con 2,5 ml de una suspensión de CL al 30% en agua destilada (concentración final de cloruro de litio del 1,5%), a distintos tiempos a lo largo del proceso de reparación: a las 0, 4 y 6 horas, manteniendo un matraz que no se suplementó con CL como control. Los recuentos de listerias se efectuaron a partir de cada uno de los matraces a las 0, 4, 6 y 24 horas en BHIA, BHIA-S y LSAMm.

La siguiente experiencia consistió en comprobar la eficacia del BHI suplementado con cloruro de litio al 1,5% (**BHI-CL**) para la recuperación de *L. monocytogenes* congeladas en presencia de la microflora habitual de diversos alimentos. Para ello se prepararon matraces con 50 ml de BHI que fueron inoculados con 0,5 ml del HA (aproximadamente 10^5 UFC/ml final) y 0,5 ml (entre 10^2 y 10^4 UFC/ml) de una SLC (*L. monocytogenes* NCTC 7973), y posteriormente suplementados con CL (1,5%) a las 0 y 4 horas de la incubación. Simultáneamente se prepararon otros matraces como control: sin suplementar el BHI con CL, y sin el inóculo del HA. Los tres matraces se mantuvieron en las condiciones adecuadas para la reparación de las LD presentes (30°C, 150 r.p.m.), realizándose los recuentos en BHIA y LSAMm a las 0, 4, 6, 20 y 24 horas.

III.F. INFLUENCIA DE DISTINTAS CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE LA RECUPERACION DE *L. monocytogenes* DAÑADA POR CONGELACION

Hasta el momento, el proceso de recuperación de las listerias tras su congelación se había realizado empleando una serie de condiciones establecidas: una temperatura de

30°C, en ambiente de aerobiosis y en agitación (150 r.p.m.). A continuación procedimos a estudiar la influencia que podría tener la variación de estas condiciones sobre la recuperación de las listerias tras su congelación.

III.F.1. Influencia de la incubación con y sin agitación

Se realizaron varias experiencias para determinar la influencia del cultivo estático, tanto sobre la reparación de las listerias lesionadas tras su congelación, como sobre su recuperación en presencia de otros microorganismos.

Con el fin de comprobar la influencia de la incubación sin agitación en la reparación de *L. monocytogenes* lesionadas tras su congelación, dos matraces con BHI y dos con BHI-CL (50 ml) se inocularon con una SLC de *L. monocytogenes* NCTC 7973. Dos de estos matraces (uno con BHI y otro con BHI-CL) se incubaron a 30°C en agitación (150 r.p.m.), mientras los otros dos se mantuvieron a la misma temperatura pero sin agitación durante el tiempo que duró el proceso. Los recuentos se realizaron a las 0, 2, 4, 6, 8 y 24 horas en BHIA, BHIA-S y LSAMm.

Para comprobar la influencia de la incubación sin agitación en la recuperación de listerias congeladas en presencia de otros microorganismos, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, excepto que los cuatro matraces se inocularon, además de con la SLC, con 0,5 ml del homogeneizado de alimentos (10^5 UFC/ml final), realizándose los recuentos a las 0 h y 1,2 y 7 días en BHIA y LSAMm.

III.F.2. Influencia de la temperatura de incubación

Se prepararon cinco matraces con BHI-CL (50 ml), que fueron inoculados con 0,5 ml de una SLC de *L. monocytogenes* NCTC 7973 y 0,5 ml del homogeneizado de alimentos. Cada uno de los matraces se llevó a incubar sin agitación a diferentes temperaturas (26, 28, 30, 34 y 37°C), realizándose los recuentos en LSAMm a las 0 horas y 1, 2 y 7 días de la incubación.

Simultáneamente se prepararon otros tres matraces con BHI (50 ml) que fueron inoculados de la misma manera e incubados a 26, 30 y 34°C, efectuándose los recuentos de la misma forma.

III.F.3. Influencia de la disponibilidad de oxígeno

A partir de unas SLC de las cepas de *L. monocytogenes* NCTC 7973, Scott A, P14 b y C 1, se inocularon por duplicado (0,5 ml) ocho matraces con BHI-CL (50 ml), a los cuales se adicionaron también 0,5 ml del HA. A continuación, cuatro de estos caldos (uno inoculado con cada cepa) se llevaron a incubar a 30°C sin agitación en condiciones de aerobiosis, mientras los otros cuatro se incubaron en una ambiente de microaerobiosis. La recuperación de las listerias inoculadas en cada uno de los caldos se comprobó mediante la siembra en LSAMm a las 0 horas y 1, 2 y 7 días de la incubación.

III.G. LIMITE DE DETECCION DE *L. monocytogenes* DAÑADA POR CONGELACION EN BHI-CL EN PRESENCIA DE OTROS MICROORGANISMOS

Varios matraces con BHI-CL (50 ml) se inocularon por duplicado con 0,5 ml del HA y con diluciones decimales decrecientes (entre 8×10^2 UFC/ml y $1,7 \times 10^2$ UFC/ml de células no dañadas) de una SLC de *L. monocytogenes* NCTC 7973. La incubación se realizó a 30°C sin agitación y en aerobiosis, realizándose los recuentos de las listerias en LSAMm a las 0, 24 y 48 horas.

III.H. EFICACIA DE DISTINTOS MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVOS PARA LA RECUPERACION DE LISTERIAS CONGELADAS EN PRESENCIA DE OTROS MICROORGANISMOS

Por último, procedimos a efectuar una comparación de la eficacia para la recuperación de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en BHI-CL y tres medios de enriquecimiento selectivos empleados habitualmente para la detección de *Listeria*: LEB (Lovett y col., 1987), UVM (Donnelly y Baigent, 1986) y PALCAM (Van Netten y col., 1989).

Estos medios de enriquecimiento fueron adquiridos deshidratados (Merck), y preparados siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.H.1. Inoculación experimental

A partir de unas SLC de *L. monocytogenes* NCTC 7973 y Scott A se procedió a su recuperación tras su congelación mediante la inoculación de cada uno de los caldos con una SLC (0,5 ml, entre 8×10^1 y 1×10^2 UFC/ml) más 0,5 ml del homogeneizado de alimentos, llevándose a continuación a incubar en aerobiosis sin agitación a 30°C. Los recuentos se efectuaron en LSAMm a las 0 y 24.

III.H.2. Productos comerciales congelados

Se realizaron varias experiencias en las que se emplearon diversos productos comerciales congelados, así como los caldos de enriquecimiento descritos anteriormente (Esquema III.3).

III.H.2.a. Alimentos empleados

Los productos utilizados fueron elegidos de tal forma que empleamos tanto alimentos que no habían sufrido ningún tipo de tratamiento térmico o incorporación de aditivos, como productos muy elaborados. Los hemos clasificado en tres grupos, de cada uno de los cuales se obtuvieron diez muestras:

1. Muestras de carne: Se incluyen las muestras de carne picada de vacuno y porcino (sin ningún tipo de tratamiento o aditivo), así como las hamburguesas de carne (que llevan aditivos como especias, antioxidantes, conservantes, etc.). Todas estas muestras, excepto la nombrada CP-2 (hamburguesas congeladas) fueron adquiridas refrigeradas en supermercados cercanos al laboratorio y trasladadas allí en refrigeración. Una vez en el laboratorio fueron rápidamente congeladas a -20°C hasta su procesamiento (uno o dos días).

2. Muestras de helado: Se emplearon helados de diferentes sabores y de diversas marcas comerciales, todos elaborados con leche pasteurizada y que además incluían en su composición diversos aditivos, como colorantes, estabilizantes y otros.

3. Muestras de pizza: Se adquirieron pizzas precocinadas ultracongeladas de diferentes marcas, prestando especial atención a su composición, intentando que ésta fuera lo más variada posible. Todas las pizzas incluían en su composición diversos aditivos (especias, antioxidantes, espesantes, etc.).

Todos los productos adquiridos congelados (helados, pizzas y las hamburguesas CP-2) se trasladaron al laboratorio en bolsas especiales para el transporte de alimentos congelados. Una vez en el laboratorio se mantuvieron a -20°C hasta su procesado (de 2 a 3 días).

III.H.2.b. Procesado de los alimentos congelados

La **descongelación** de los productos se efectuó tomando una porción de aproximadamente 150 g de cada muestra, manteniendo el resto en congelación por si era necesario repetir alguna experiencia. Para la descongelación de las muestras de carne y de pizzas, se mantuvieron las porciones en refrigeración una noche, mientras que en el caso de las muestras de helado, al descongelarse fácil y rápidamente, no fue necesario, ya que se fueron descongelando durante su procesado.

Tras la descongelación, de cada muestra (150 g) se tomaron cinco porciones:

- Una porción de 10 g se empleó para efectuar una **siembra directa** por duplicado en LSAMm tras su homogeneización con PBS (90 ml).
- Cuatro porciones de 25 g cada una se homogeneizaron con cada uno de los cuatro caldos de enriquecimiento selectivos (225 ml).

III.H.2.c. Recuperación de las listerias presentes en las muestras

El proceso de recuperación se llevó a cabo en las mismas bolsas de

homogeneización, que fueron selladas y llevadas a incubar (30°C, 24 horas). Tras la incubación se realizaron los recuentos de *Listeria* en LSAMm a partir de las diluciones decimales adecuadas.

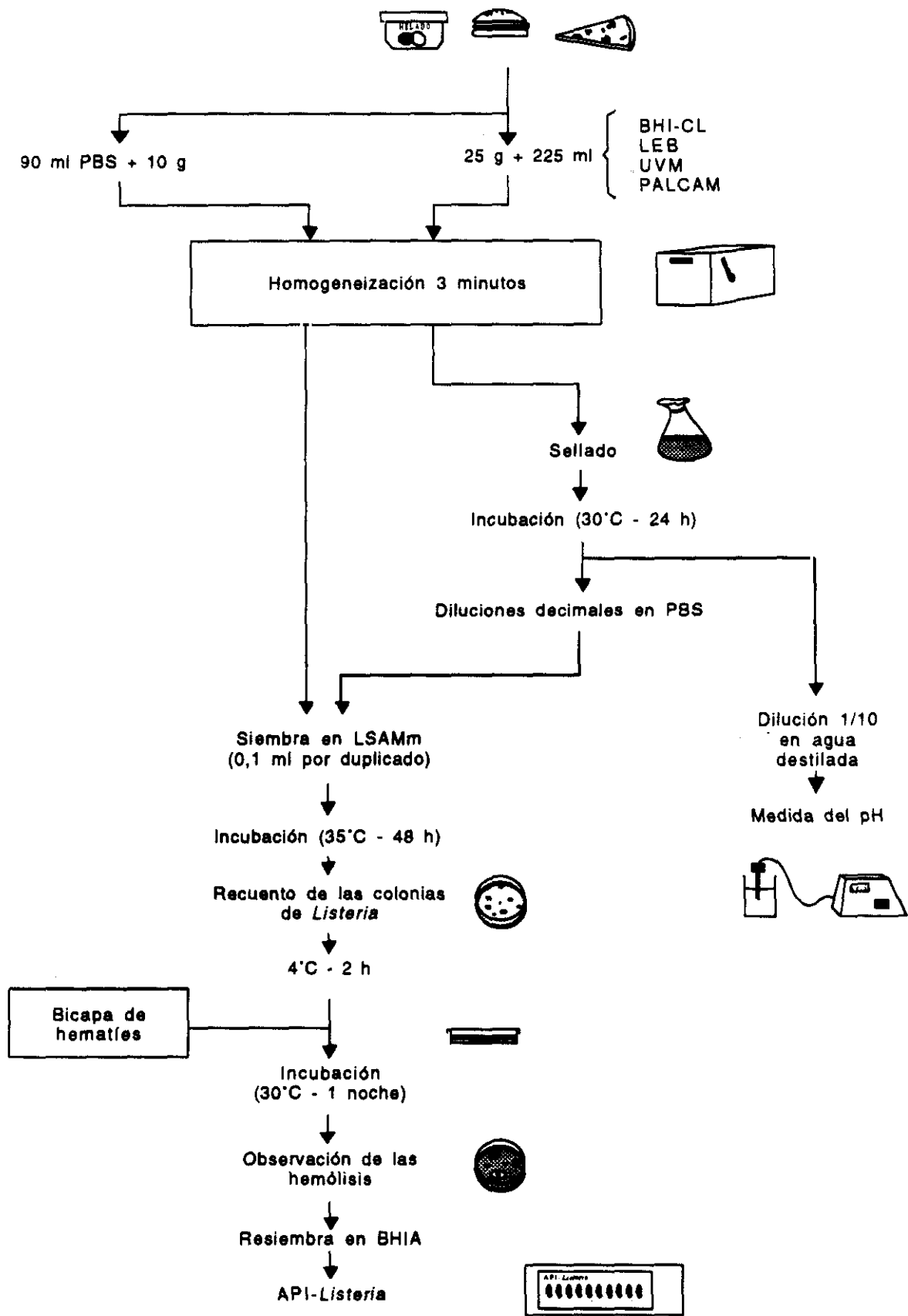
Como estudio complementario, se procedió a la medida del pH en cada uno de los caldos de enriquecimiento tras el proceso de reparación de las muestras, realizándose una dilución 1/10 a partir de cada caldo, donde se efectuó la medición del pH.

III.H.2.d. Determinación de la hemólisis de las colonias de *Listeria* y su identificación

Los recuentos de las colonias sospechosas de *Listeria* en LSAMm, tanto a partir de la siembra directa como tras el enriquecimiento, se efectuaron atendiendo a su característica morfología en LSAMm (Blanco y col., 1989).

En las placas de LSAMm en que se observó un crecimiento moderado de listerias (entre 30 y 100 colonias), se procedió a la adición de una bicapa de agar-eritrocitos según la metodología desarrollada por nosotros anteriormente (Domínguez y col., 1990). Tras la observación de la presencia y el tipo de hemólisis desarrollada por las colonias de *Listeria*, procedimos a resembrar en BHIA dos o tres colonias representativas de cada tipo (colonias no hemolíticas, poco hemolíticas y hemolíticas), realizándose su posterior identificación mediante el empleo del sistema API-*Listeria*.

ESQUEMA III.3. DETECCIÓN DE *Listeria* spp. Y *L.monocytogenes* EN PRODUCTOS COMERCIALES CONGELADOS



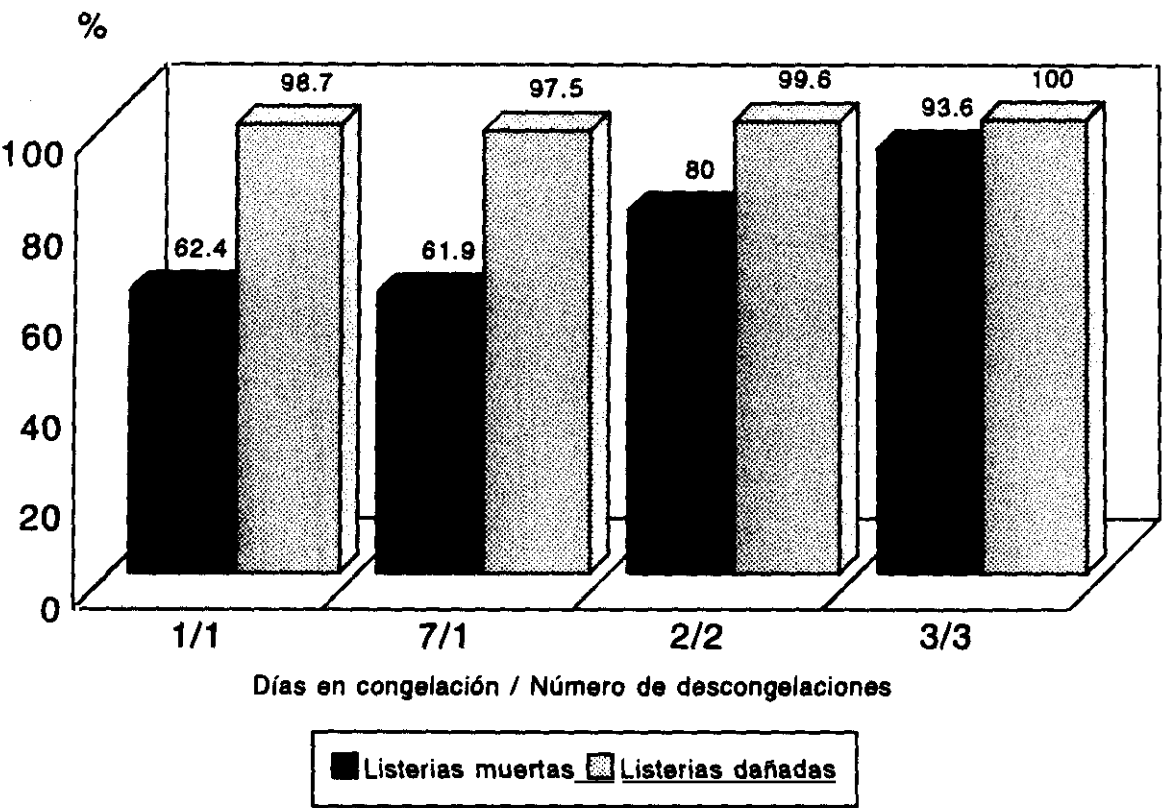
RESULTADOS Y DISCUSION

IV.A. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CONGELACION/DESCONGELACION DE UNA SUSPENSION DE LISTERIAS SOBRE LA MUERTE Y EL DAÑO CELULAR

IV.A.1. Influencia del tiempo en congelación

Según nuestras experiencias, no existe diferencia apreciable tanto respecto al número de listerias viables totales, como en el porcentaje de éstas que se encuentran dañadas subletalmente, cuando el tiempo de almacenamiento en congelación se prolonga de uno a siete días, al menos cuando se parte de una concentración inicial de listerias alta (9-10 log/ml) (Figura IV.1a). En este caso encontramos unos valores de muerte celular de alrededor del 60%, mientras que los porcentajes de listerias dañadas son del 98,7 y 97,5% tras un almacenamiento de 1 y 7 días respectivamente.

Figura IV.1a Influencia del tiempo en congelación y número de ciclos de congelación/descongelación sobre la viabilidad y el daño celular en *L. monocytogenes* (% de células muertas y dañadas)



Concentración inicial de *L. monocytogenes*: 9-10 log/ml

La mayoría de los autores que han estudiado el comportamiento de *L. monocytogenes* durante su congelación y almacenamiento en estas condiciones durante periodos prolongados de tiempo, coinciden en la gran resistencia a los efectos letales de la congelación sobre una suspensión de listerias (7-8 log/ml) en un medio nutritivo (TPB, homogeneizados estériles de alimentos) (Golden y col., 1988a y 1988b; Oscroft, 1989; Palumbo y Williams, 1991; Harrison y col., 1991; Warburton y col., 1992). Así, Golden y col., (1988a y 1988b) encuentran únicamente un descenso en la población viable de listerias de 0,1 y 0,2 log (el 3 y 6% del total) tras un almacenamiento de una suspensión de listerias a -20°C durante 7 y 14 días respectivamente. Durante periodos más prolongados de almacenamiento en congelación, parece ser que existe un ligero descenso en la viabilidad de las células (Oscroft, 1989), aunque no significativa. Los resultados obtenidos por El-Kest y Marth (1991) a este respecto, sin embargo son muy diferentes, señalando una muerte celular del 58 al 93% de una suspensión de listerias en PBS (6 log/ml) a las 48 horas y del 91 al 99% tras 4 semanas de almacenamiento a -20°C. Las diferencias entre los resultados obtenidos por estos autores y los mencionados anteriormente podrían deberse al medio de suspensión empleado, ya que el efecto de la congelación sobre la muerte y el daño celular se ve influenciado por el número y la naturaleza de las moléculas en solución. Así, muchos componentes habituales de los alimentos (azúcares, péptidos, etc.) pueden proteger a los microorganismos del daño por congelación, reduciendo el porcentaje de células muertas, por lo que un caldo como el TPB o un homogeneizado de alimentos podrían ejercer un cierto efecto "protector" celular (Olson y Nottingham, 1980; El-Kest y Marth, 1991b). En nuestras experiencias, sin embargo, el medio de suspensión empleado fue igualmente PBS y, aunque el tiempo de almacenamiento en congelación fue menor que en el trabajo de El-Kest y Marth (1991a) (una semana frente a cuatro semanas), según estos autores, la mayor parte de la muerte celular ocurre en las primeras horas de la congelación, por lo que la variación de tiempos de almacenamiento no influiría significativamente en los resultados; por tanto, habría que buscar otra explicación a las diferencias encontradas, que podría ser la cantidad de inóculo inicial (ver epígrafe IV.A.3).

Respecto al daño celular causado por la congelación, tampoco hemos encontrado diferencias cuando el tiempo de almacenamiento en congelación se prolonga de 1 a 7 días (98,7 y 97,5% respectivamente. Otros autores, sin embargo, señalan un aumento del daño celular al prolongar el tiempo en congelación. Así, El-Kest y Marth (1991b) señalan un

aumento de hasta el 30% cuando el tiempo en congelación se prolonga de 24 horas a dos o tres semanas (hasta el 60% de células dañadas), y Golden y col. (1988a), encontraron un incremento de hasta el 20% más de listerias lesionadas tras dos semanas a -18°C (hasta el 82% de células dañadas) con respecto a las valoradas tras una semana. Warburton y col. (1992) coinciden con lo indicado por Golden y col. (1988a), señalando un porcentaje de daño celular del 90% cuando las suspensiones eran mantenidas a -20°C durante 3,5 meses. Por otra parte, el hecho de que algunos autores señalen la ausencia, o una proporción no significativa de células dañadas por la congelación (Oscroft, 1989), puede ser consecuencia, al igual que ocurría con respecto a la muerte celular, del efecto protector del medio de suspensión, que en este caso consistía en un homogeneizado estéril de alimentos.

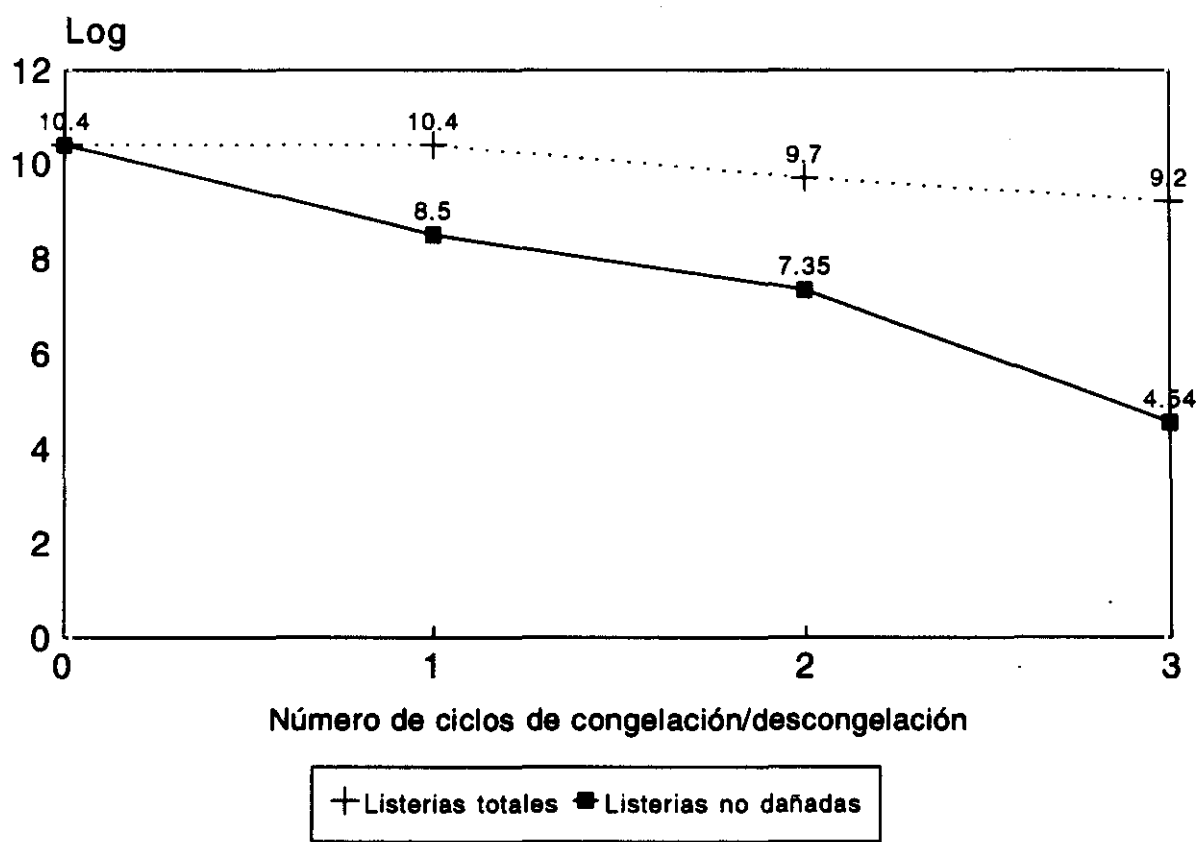
IV.A.2. Efecto del número de ciclos de congelación/descongelación aplicados

Aunque la norma general en cuanto al manejo es que un alimento que se comercializa congelado sufra un único ciclo de congelación/descongelación (es decir, congelación en el lugar de producción y descongelación a la hora de su consumo), puede ocurrir que, en algún momento durante el manejo de estos productos, se interrumpa la cadena del frío. Esto sucedería principalmente durante su traslado, bien desde la fábrica al lugar de distribución (carga y descarga de los productos, su colocación en el comercio), o bien desde el comercio hasta el hogar de los consumidores si no se emplean envases adecuados para su transporte (bolsas isotérmicas). Por este motivo, decidimos estudiar cómo influye la aplicación de más de un ciclo de congelación/descongelación en la supervivencia y el daño celular de las listerias que podrían estar presentes en estos alimentos.

En este sentido, aunque algunos autores han señalado la influencia del número de ciclos de congelación/descongelación (El-Kest y col., 1991) sobre la muerte y el daño subletal en *L. monocytogenes*, en general, la mayoría de ellos aplican en sus experiencias un único ciclo (Golden y col., 1988a y 1988b; Oscroft, 1989; El-Kest y Marth, 1991a y 1991b; Budu-Amoako y col., 1992; Martin y Katz, 1993). Según los resultados obtenidos en nuestras experiencias, el incremento del número de ciclos de congelación/descongelación aplicados a una suspensión de listerias afecta de una forma

significativa a la viabilidad de *L. monocytogenes*. Así, cuando se aplicaron dos ciclos sucesivos, con un intervalo de 24 horas, los porcentajes de listerias muertas y dañadas durante el proceso aumentan del 0 al 80%, y del 97,5 al 99,6% respectivamente. Este incremento es mayor todavía cuando se aplicaron tres ciclos, con unos resultados del 93,6% de listerias muertas y del 100% de listerias dañadas (Figuras IV.1a y 1b).

Figura IV.1b Influencia del número de ciclos de congelación/descongelación sobre la supervivencia y el daño celular en *L. monocytogenes*



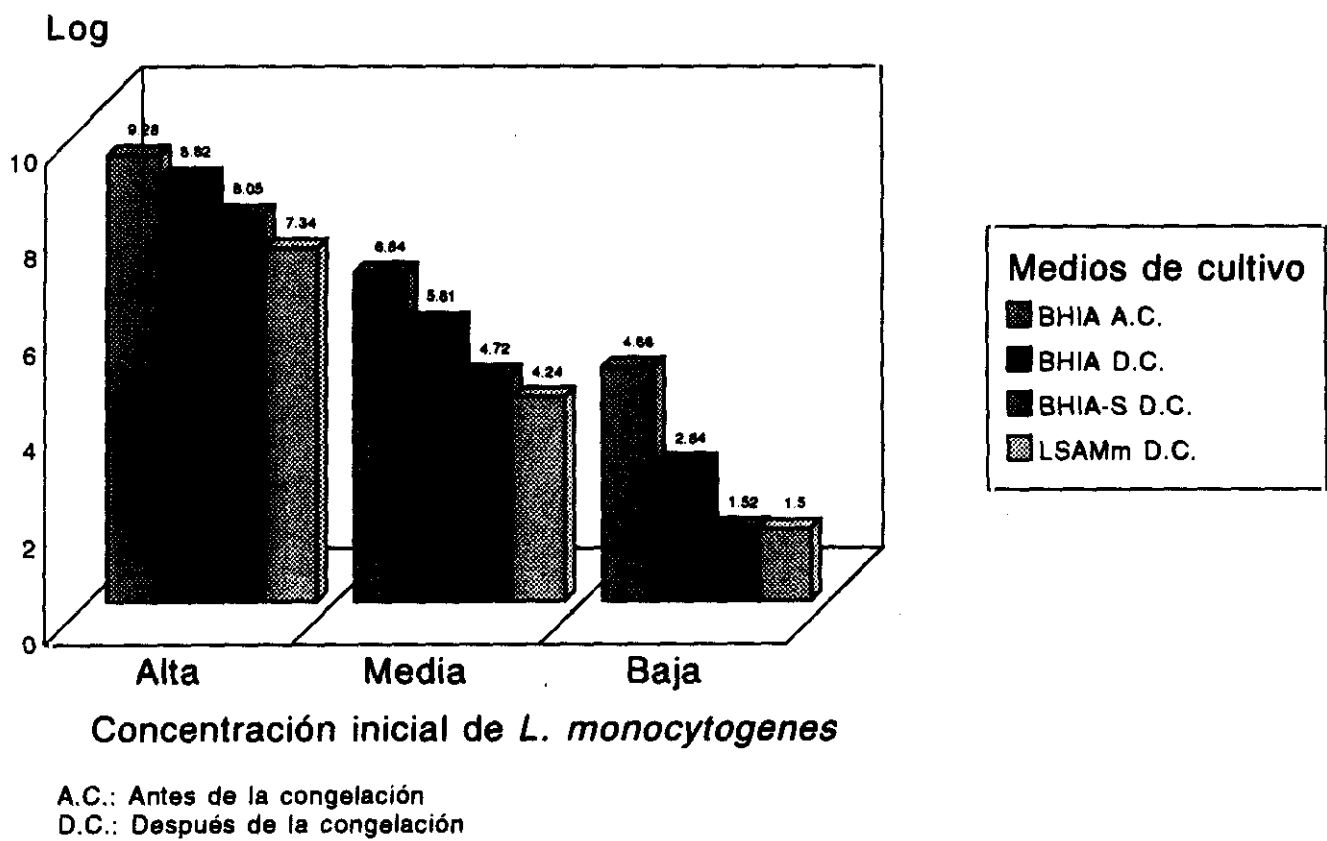
IV.A.3. Concentración de listerias

Parece ser que uno de los efectos observados cuando se produce un daño subletal en una población bacteriana es la salida de la célula de material de bajo peso molecular,

incluyendo péptidos y aminoácidos, lo cual indica una alteración en la membrana celular. Cuando existe una gran cantidad de microorganismos, esta pérdida de sustancias de bajo peso molecular proporcionaría un cierto grado de crioprotección, lo que se traduciría en un menor porcentaje de células muertas y dañadas (Brown, 1993).

A este respecto, los resultados obtenidos a partir de las experiencias realizadas con distintas concentraciones de listerias muestran una clara influencia de la concentración de listerias sobre los efectos sufridos por éstas tras un proceso de congelación (Tabla IV.1 y Figura IV.2). Así, se puede apreciar que cuando la concentración inicial de listerias en la suspensión es alta (entre 8 y 10 log), el porcentaje de listerias muertas tras la descongelación es notablemente menor (65,4%) que en los casos en que la concentración es media (6-8 log) o baja (4-6 log), con unos porcentajes de mortalidad del 90,6 y 99,0% respectivamente.

Figura IV.2 Influencia de la concentración de listerias sobre la viabilidad y el daño celular en *L. monocytogenes*



Estos resultados concuerdan con los obtenidos por El-Kest y Marth (1991a), que encontraron una mortalidad del 91 al 99% tras cuatro semanas a -18°C cuando el inóculo inicial era de 6 log/ml. Oscroft (1989), sin embargo, no encontró diferencias en la mortalidad ni en el porcentaje de listerias dañadas por congelación cuando empleó dos concentraciones diferentes de bacterias (8-10 log y 4-6 log/ml), aunque señala una sensibilidad ligeramente mayor a la congelación de la cepa de *L. monocytogenes* 433 cuando su concentración era de 4-6 log/ml en un homogeneizado de pollo estéril.

En cuanto al porcentaje de listerias dañadas subletalmente, hay que decir que se han encontrado diferencias según el medio de cultivo empleado (Tabla IV.1 y Figura IV.2). Así, los resultados obtenidos en BHIA-S muestran también una clara influencia de la concentración inicial sobre la inhibición del crecimiento de las listerias dañadas, con unos valores del 83,1% partiendo de una concentración inicial alta, que aumentan hasta el 95,2 cuando la concentración es baja. En LSAMm, sin embargo, los valores de inhibición fueron muy semejantes independientemente de la concentración inicial de listerias (entre el 95,4 y el 97,3%) (Tabla IV.1). Estas diferencias entre los medios LSAMm y BHIA-S podrían deberse a la existencia de distintos grados de daño celular por congelación (Varabioff, 1990; Mendonca y Knabel, 1994). A este respecto, parece ser que cuando se aplica un tratamiento con altas temperaturas (62,8°C, 6 minutos) a una suspensión de listerias, dentro de la población de listerias que sufren un daño subletal, se pueden diferenciar dos tipos de células: las "muy dañadas" y las "moderadamente dañadas", según sus condiciones para crecer en medios más o menos inhibitorios. En el caso de un tratamiento por congelación, podemos pensar que la situación es similar, por lo que aplicando esta teoría, en BHIA-S no crecerían las listerias muy dañadas, mientras que sí permitiría el crecimiento de las moderadamente dañadas. En LSAMm, sin embargo, se inhibiría el crecimiento de todas las células dañadas. De esta forma, podría ser que al disminuir la concentración inicial de listerias hubiera mayor proporción de células que hubieran sufrido un daño mayor y, por lo tanto, explicaría el aumento de la inhibición del crecimiento en BHIA-S.

TABLA IV.1. Influencia de la concentración inicial de *L. monocytogenes* sobre la destrucción y recuperación de células dañadas subletalmente por la congelación *

CONCENTRACION INICIAL DE <i>L. monocytogenes</i>	BHIA			BHIA-S		LSAMm	
	A.C.	D.C.	MUERTAS	D.C.	DAÑADAS	D.C.	DAÑADAS
ALTA (10^8 - 10^{10} UFC/ml)	9,28	8,82	65,4%	8,05	83,1%	7,3	97%
MEDIA (10^6 - 10^8 UFC/ml)	6,84	5,81	90,6%	4,72	91,9%	4,24	97,3%
BAJA (10^4 - 10^6 UFC/ml)	4,86	2,84	99,0%	1,52	95,2%	1,5	95,4%

A.C.: Crecimiento antes de la congelación (Log)

D.C.: Crecimiento después de la congelación (Log)

* Un ciclo de congelación/descongelación

IV.B. EFICACIA DE DISTINTOS MEDIOS SELECTIVOS PARA EL AISLAMIENTO DIRECTO DE *Listeria* TRAS SU CONGELACION

En los últimos años se han descrito una gran cantidad de medios de aislamiento selectivo para *Listeria*, con la incorporación en su formulación de una gran variedad de compuestos inhibidores del crecimiento de otros microorganismos distintos de *Listeria* (antibióticos, como la polimixina B, ceftazidima, etc.), así como componentes indicadores del crecimiento de listerias en el medio (esculina, telurito potásico, etc.). Algunos autores han realizado estudios comparativos sobre la utilidad de varios de estos medios de cultivo selectivos para el aislamiento de bajas cantidades de *L. monocytogenes*, así como de *L. monocytogenes* dañadas subletalmente por calor o congelación, tanto en cultivo puro como en alimentos inoculados con suspensiones de esta bacteria (Golden y col., 1988b; Palumbo y Williams, 1991; Warburton y col., 1992), siendo los resultados obtenidos muy dispares en función de los medios empleados. Así, mientras Golden y col. (1988) no encuentran diferencias en la recuperación de *L. monocytogenes* antes y después de la congelación en los medios empleados, Palumbo y Williams (1991) y Warburton y col. (1992) encuentran inhibiciones del crecimiento de *L. monocytogenes* en los medios selectivos tras la congelación de hasta el 99% con respecto a los recuentos anteriores al tratamiento.

Dada la disparidad de resultados, así como el hecho de que algunos de los medios de cultivo evaluados por estos autores han sido mejorados, incrementando tanto su selectividad como su especificidad, quisimos comprobar la eficacia de los medios de cultivo más selectivos y específicos que se han desarrollado para el aislamiento de *Listeria* para la recuperación de listerias dañadas subletalmente por congelación, dado que en experiencias previas habíamos determinado la eficacia de estos medios para la recuperación de *Listeria*, encontrando que mostraron una eficacia similar para el aislamiento de listerias que no habían sufrido ningún tipo de tratamiento físico o químico (Domínguez y col., 1990).

Los resultados no fueron iguales cuando se estudió el comportamiento de estos mismos medios para la recuperación de listerias que habían sufrido un proceso de congelación. Así, los porcentajes medios de inhibición del crecimiento de las listerias dañadas por congelación (número de bacterias viables totales entre 4 y 8 log/ml) fueron

muy similares en PALCAM (97,0%) y en LSAMm (93,5%), siendo menores en OXFORD y en LPM (83,1 y 79,4% respectivamente) (Figuras IV.3a a 3d). Un análisis de varianza realizado sobre los datos obtenidos a partir de todas las experiencias realizadas (un total de doce) reveló que no había diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los resultados encontrados en LSAMm y cada uno de los tres restantes medios de cultivo selectivos, así como con el medio empleado como referencia, BHIA-S.

En estudios previos llevados a cabo sobre la capacidad de estos medios para inhibir el crecimiento de otros microorganismos distintos de *Listeria* (microorganismos presentes naturalmente en diversos alimentos cármicos y lácteos, así como en ensilados), los medios que presentaron mayor inhibición del crecimiento de estos microorganismos fueron LSAMm y PALCAM, seguidos por LPM y OXFORD (Domínguez y col., 1990; Fernández-Garayzábal y col., 1992). Algunos autores han señalado una relación entre la selectividad del medio y el grado de inhibición del crecimiento de las listerias dañadas (es decir, cuanto mayor sea la cantidad o concentración de agentes inhibitorios del medio de cultivo, mayor será su selectividad, pero más difícil será el crecimiento en él de células que hayan experimentado algún tipo de lesión subletal). Esta consideración tiene gran importancia desde el punto de vista del análisis microbiológico de los alimentos, sobre todo teniendo en cuenta que los niveles de contaminación por *Listeria* son habitualmente bajos, a menudo incluso inferiores a 10^2 UFC/ml ó g (ver epígrafe I.B.1); por tanto, el medio de cultivo empleado para su aislamiento debe ser suficientemente selectivo como para permitir su detección, aún en presencia de una gran cantidad de otros microorganismos, y lo menos inhibitorio posible para el crecimiento de las listerias dañadas subletalmente. A este respecto hay que señalar la diferencia entre los medios LSAMm y PALCAM, similares en cuanto a los agentes inhibitorios que contienen, siendo, sin embargo, LSAMm menos inhibitorio para las células de *Listeria* dañadas por congelación.

IV.C. REPARACION DE LISTERIAS DAÑADAS SUBLETALMENTE POR CONGELACION EN BHI

Como hemos señalado anteriormente, las células bacterianas que han sufrido una lesión celular, fundamentalmente por algún tipo de tratamiento térmico o, en el caso que nos ocupa, al ser sometidas a temperaturas muy bajas, ven incrementados sus

Inhibición del crecimiento de *Listeria* tras su congelación en distintos medios selectivos de aislamiento respecto al crecimiento en BHIA

Figura IV.3a

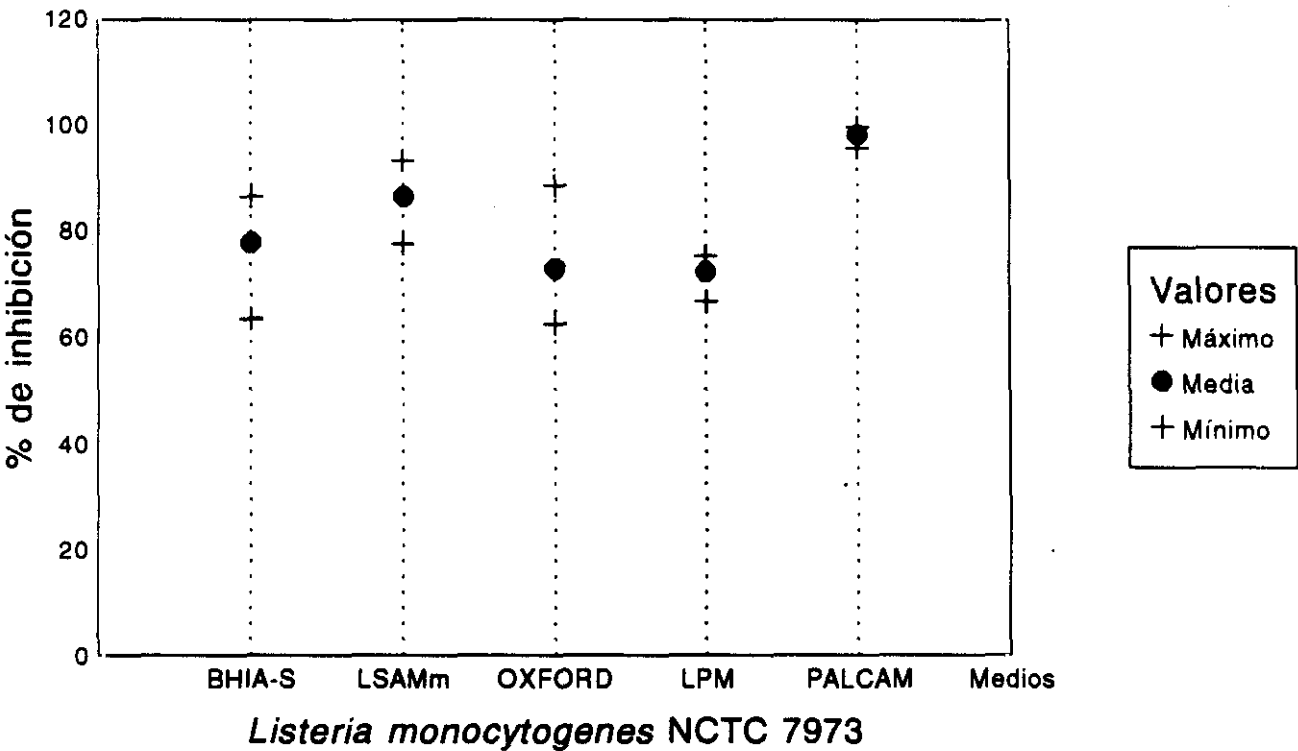


Figura IV.3b

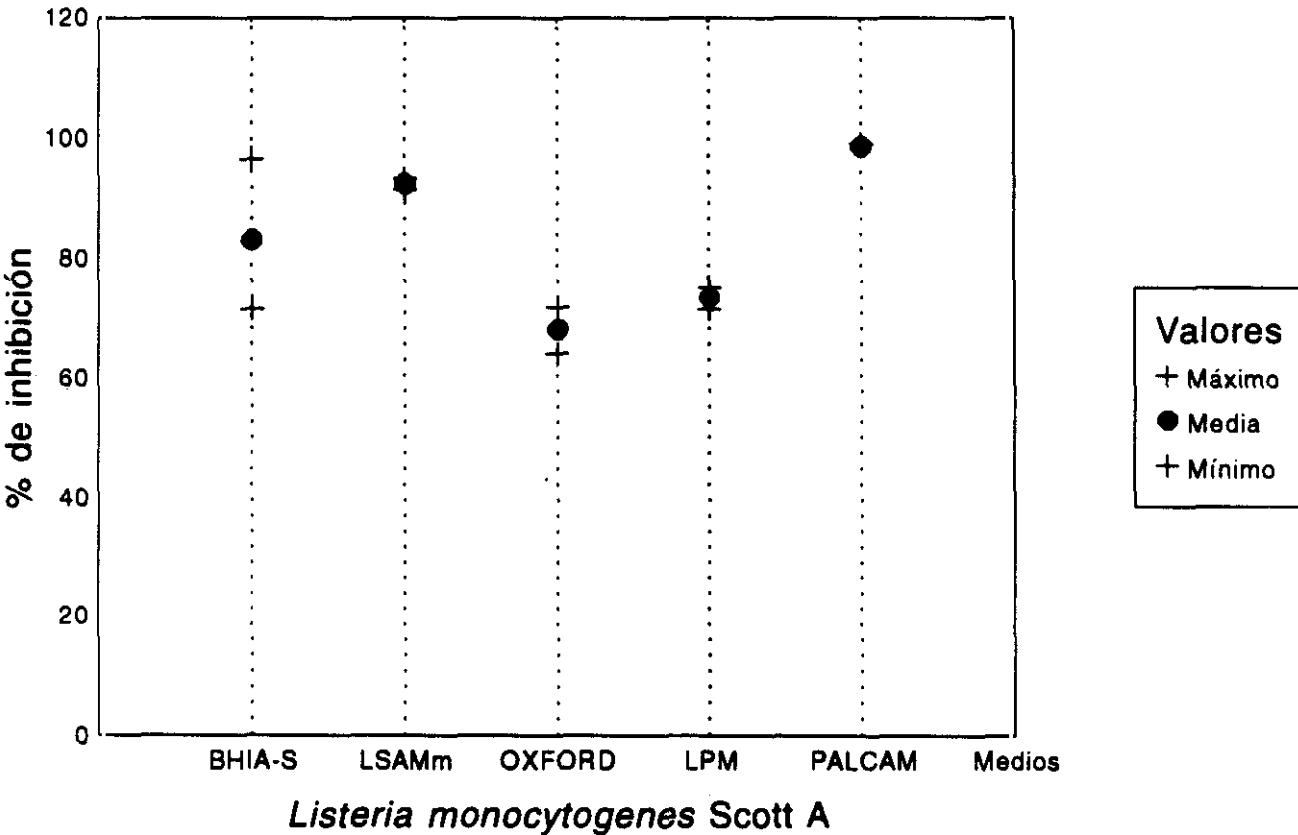


Figura IV.3c

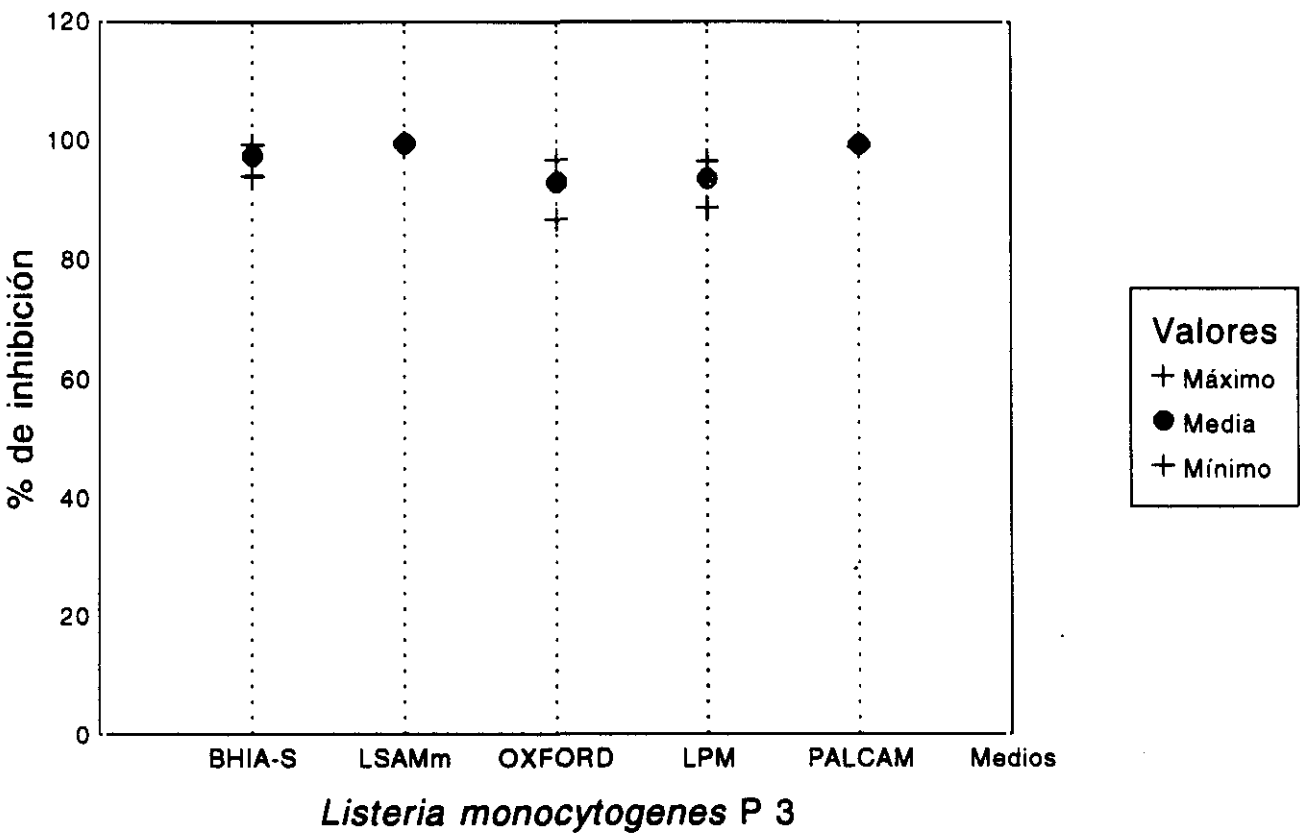
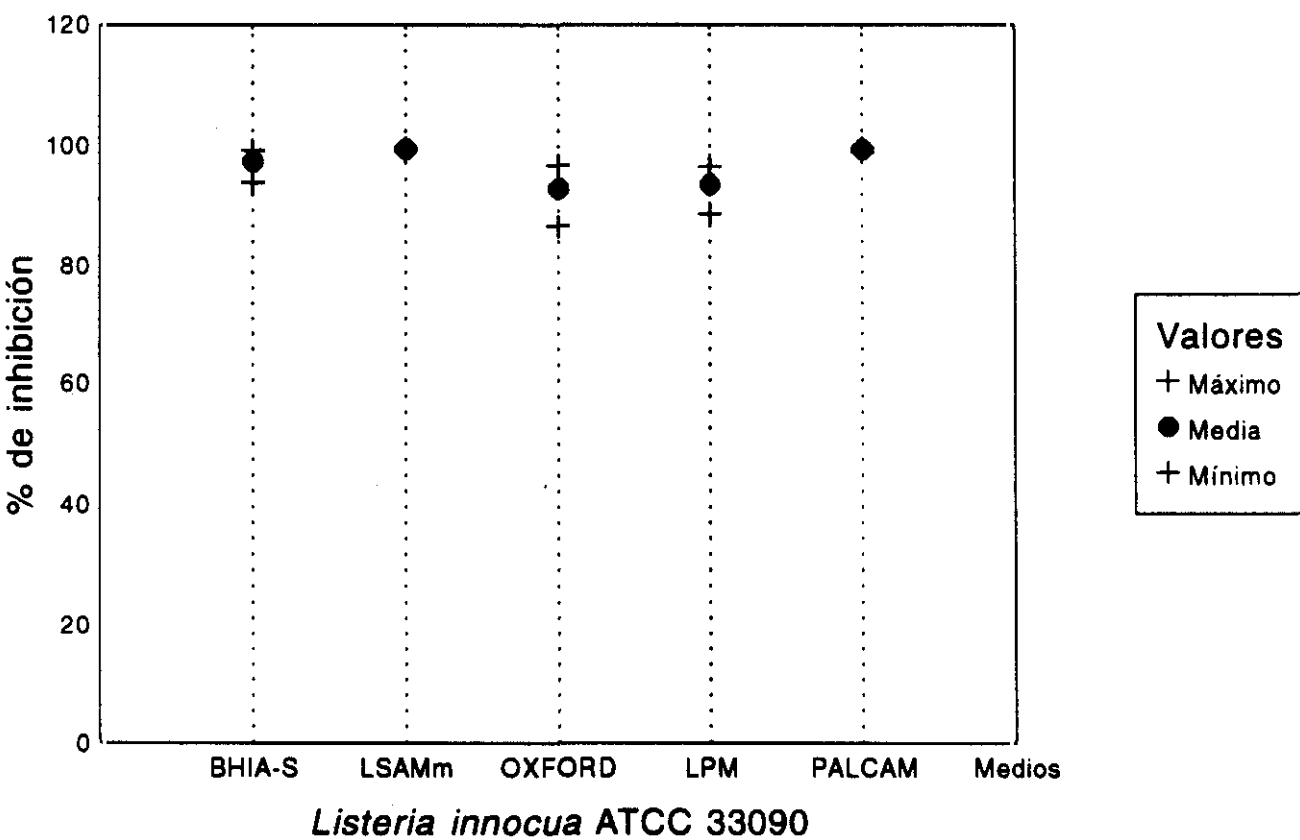


Figura IV.3d



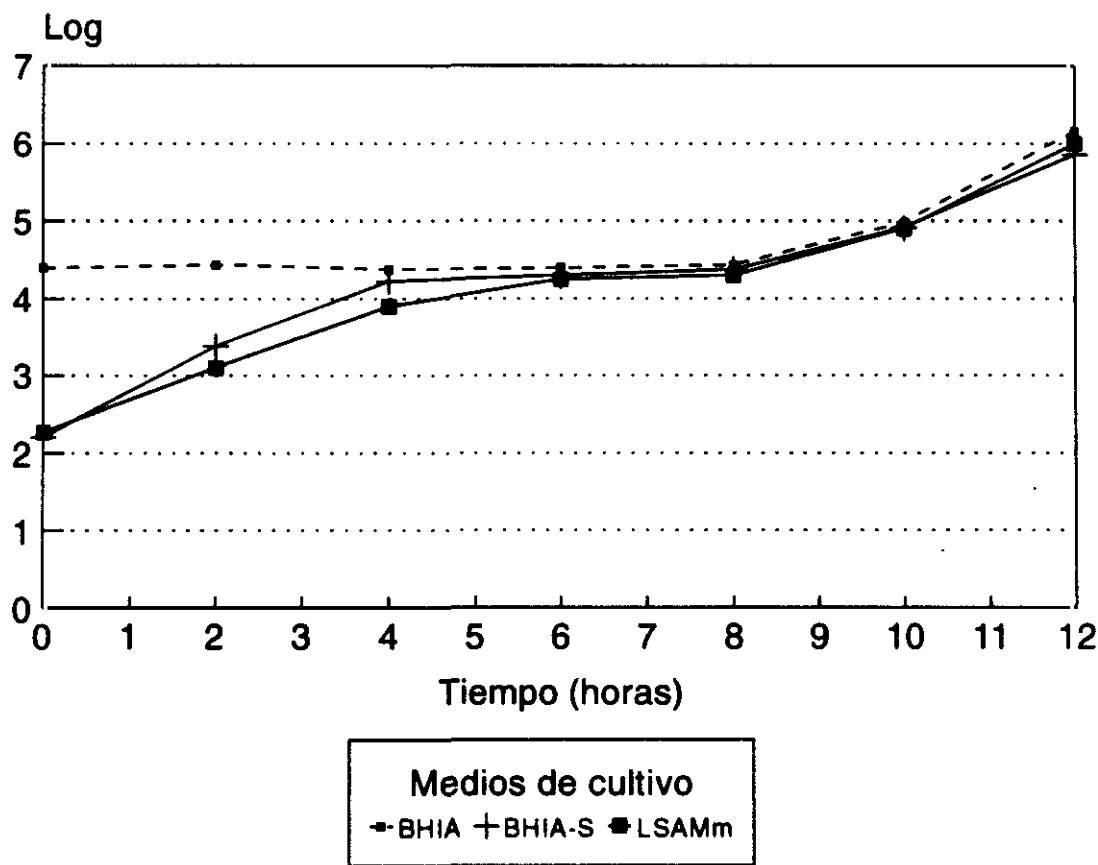
requerimientos nutritivos, a la vez que pierden su capacidad para crecer en medios altamente selectivos, por un aumento de su sensibilidad a los compuestos inhibitorios. Es necesario, por tanto, para su detección, situar estas bacterias en unas condiciones favorables, no inhibitorias, que favorezcan su reparación, antes de proceder a su aislamiento en un medio selectivo (Brown, 1993). Así, durante el proceso de reparación, las listerias que hubieran sufrido una lesión celular recuperarían sus condiciones originales, entre ellas el poder patógeno (en el caso de *L. monocytogenes*) y la resistencia a los compuestos inhibidores de los medios selectivos (McCarthy, 1991; Bush y Donnelly, 1992).

Aunque existe una concordancia general entre los distintos autores en cuanto a la capacidad de reparación de las células bacterianas tras un tratamiento subletal, existe, sin embargo una discrepancia en lo que respecta a cuáles son las condiciones idóneas para que esta reparación tenga lugar lo más favorablemente posible, habiéndose propuesto como óptimos tanto medios ricos como medios mínimos (van Schothorst, 1976). Pruebas preliminares en las que empleamos medios mínimos (vitaminas, aminoácidos, etc), no mostraron una mayor eficacia de éstos para la reparación de *L. monocytogenes* dañada subletalmente por efecto de la congelación, en comparación con la reparación en un medio complejo (BHI), por lo que centramos nuestro estudio en la utilización del BHI por su facilidad de preparación y su amplia utilización en los laboratorios de Microbiología.

Procedimos a estudiar, por tanto, la reparación de las células de *Listeria* dañadas tras un ciclo de congelación/descongelación en un medio nutritivo rico como es el BHI. En este estudio, las cuatro cepas de *Listeria* empleadas mostraron un comportamiento similar (Figura IV.4), finalizando la reparación de las células dañadas (entre el 85 y el 99% de las células viables) a 30°C a las 6 horas de incubación, si bien, en las experiencias realizadas con *L. innocua*, el proceso fue algo más rápido (4-5 horas). La finalización del proceso de reparación se determinó cuando los recuentos bacterianos obtenidos en los medios inhibitorios (BHIA-S y LSAMm) alcanzaron los valores obtenidos en el medio no selectivo (BHIA), teniendo en cuenta que durante este tiempo no existió incremento significativo de los recuentos en BHIA. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores sobre la reparación de *L. monocytogenes* dañada subletalmente por congelación o por calor en medios ricos no selectivos formulados tomando como base TSB. Así, Budu-Amoako y col. (1992) indican una reparación de *L. monocytogenes* dañada por efecto del calor (60°C, 5 minutos) o la congelación (-20°C, 7 días) al cabo de 6-8 horas en TSB

suplementado con extracto de levadura, mientras que para otros autores el tiempo de reparación sería más corto (entre 4 y 5 horas) en TSB suplementado además con otros compuestos favorecedores de la reparación celular, como el piruvato sódico (Busch y Donnelly, 1992; Martin y Katz, 1993). No obstante, todos ellos coinciden en la necesidad de la utilización de un medio que permita la reparación de las células dañadas antes de proceder al empleo de medios selectivos.

Figura IV.4 Reparación de *L. monocytogenes* dañada por congelación en BHI



IV.D. INFLUENCIA DEL CLORURO DE LITIO (CL) EN LA REPARACION Y EL CRECIMIENTO DE *L. monocytogenes* DAÑADA POR CONGELACION

Algunos autores han propuesto una metodología a seguir para la detección de listerias a partir de muestras que hayan sido sometidas a algún tratamiento (calor, congelación), que consiste en la incubación de la muestra en medio líquido no selectivo durante el tiempo necesario para la reparación de las células viables pero dañadas y, a continuación, hacer al caldo selectivo mediante la adición a éste de los agentes inhibitorios necesarios para impedir el crecimiento de otros microorganismos distintos de *Listeria*. El tiempo de incubación en el medio no selectivo varía según las condiciones de incubación, fundamentalmente de la temperatura, oscilando entre 4-8 horas a 30-35°C (Budu-Amoako y col., 1992; Martin y Katz, 1993; Yu y Fung, 1993) y 3-7 días empleando temperaturas de refrigeración (Varabioff, 1990; McCarthy, 1990). Sería esta metodología, por tanto, un enriquecimiento en dos pasos que permitiría la reparación de las listerias dañadas presentes en la muestra y su posterior crecimiento en el medio líquido selectivo.

IV.D.1. Efecto del CL sobre el crecimiento de la microflora presente habitualmente en los alimentos

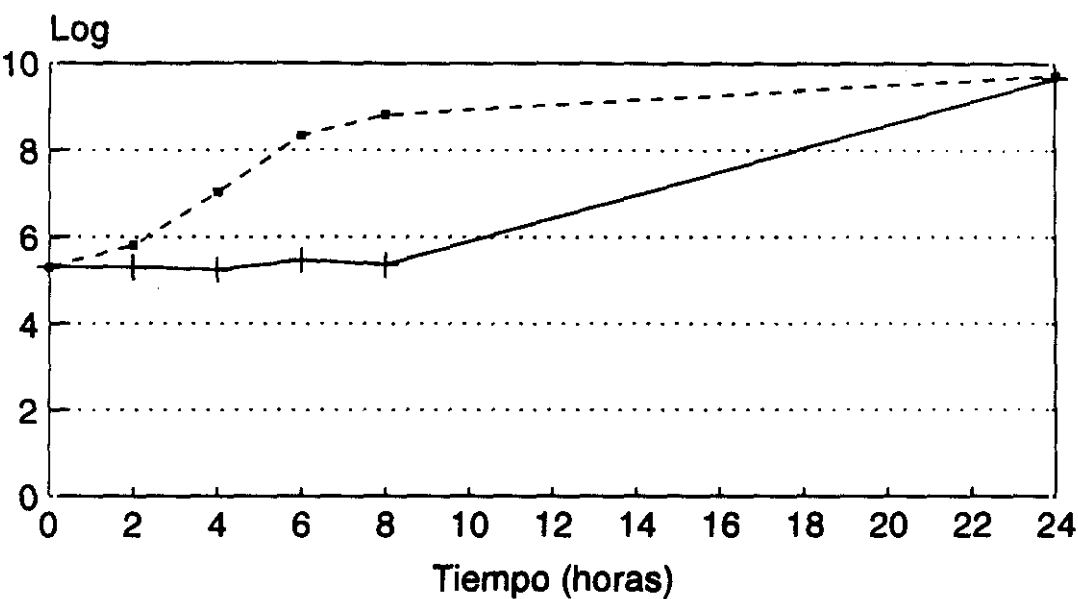
El cloruro de litio (CL) es uno de los compuestos empleados en la formulación de la mayoría de los medios selectivos para *Listeria* diseñados en los últimos años, tanto en medios de aislamiento como en caldos de enriquecimiento (Tablas I.4 y I.5), habiéndose comprobado que la adición de CL a las concentraciones empleadas en estos medios (entre el 0,5 y el 1,5%), no tiene efecto inhibitorio apreciable sobre el crecimiento de las listerias presentes en el medio (Cox y col., 1990; Domínguez y col., 1990; Mendonca y Knabel, 1994). Su efecto sobre los microorganismos presentes en los alimentos, sin embargo, es significativamente inhibitorio, siendo el CL responsable en gran medida de la alta selectividad de los medios para *Listeria*. Así, experimentos previos en los que comprobamos la efectividad del medio LSAMm sin CL para la inhibición del crecimiento de los microorganismos del homogeneizado de alimentos (HA) (7 log/ml), mostraron que su selectividad se veía notablemente reducida con respecto a la del LSAMm; así, mientras en LSAMm la inhibición del crecimiento de estos microorganismos fue prácticamente total, en LSAMm sin CL se obtuvieron unos recuentos de alrededor de 5 log/ml.

En el estudio que realizamos sobre la influencia que podía ejercer el CL sobre el crecimiento de microorganismos del HA en medio líquido, pudimos observar que la adición de CL (1,5%) a un cultivo del HA en BHI (concentración de microorganismos totales de 5,3 log/ml) a distintos tiempos de la incubación tuvo un efecto inhibitorio apreciable sobre el crecimiento de estos microorganismos. Así, aunque los recuentos de mesófilos totales a las 24 horas de incubación fueron similares independientemente de la adición de CL (aproximadamente 10 log/ml), sin embargo, su crecimiento en las primeras horas de incubación fue muy diferente en función del momento de incorporación del CL (Figuras IV.5a a 5d). Así, al menos durante las primeras 8 horas de incubación a partir del momento de la adición del CL, el crecimiento de estos microorganismos se vio inhibido. Como se puede apreciar (Figura IV.5a), la fase de latencia en BHI sin CL es muy corta (unas 2 horas), alargándose ésta hasta al menos 8 horas cuando se ha incorporado al medio CL (1,5%).

En cuanto a la influencia del CL en la evolución de los principales grupos bacterianos presentes en el HA, destacó el elevado crecimiento en el grupo de las bacterias que crecieron en BP (de 1,8 a 7,7 log/ml), mientras que permaneció estable la población de bacterias que crecieron en KAA (4,3 log/ml) (Figura IV.6). Hay que tener en cuenta que el medio KAA se emplea habitualmente para el aislamiento de microorganismos del grupo de los estreptococos, y que son precisamente los enterococos, las bacterias que mayor dificultad crean para la detección de *Listeria* a partir de alimentos (Buchanan, 1990), por lo que una inhibición de su crecimiento redundaría en una mayor facilidad para la detección de las listerias presentes. Similares resultados han obtenido Cox y col. (1990) y Mendonca y Knabel (1994), quienes señalan un efecto bacteriostático del CL sobre *Streptococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* a unas concentraciones entre el 1 y el 2%. En este sentido, aunque no se conoce bien en qué consiste el efecto inhibitorio del CL sobre el crecimiento de los enterococos, se ha sugerido su competición con cationes divalentes esenciales, como calcio y magnesio (Birch, 1974); de esta forma podrían quedar inactivadas algunas metaloenzimas esenciales cuando el catión monovalente Li^+ reemplaza a los cationes divalentes de dichas enzimas (Mendonca y Knabel, 1994).

Crecimiento de la microflora natural del HA en BHI-CL

Figura IV.5a

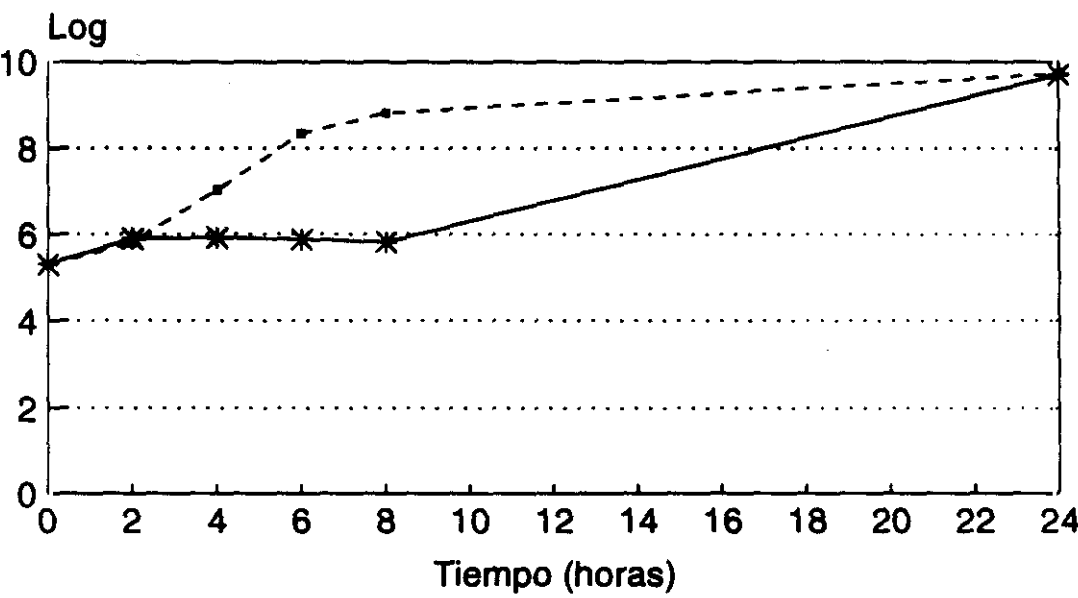


Adición del CILi a las 0 horas

— sin CILi + con CILi

Recuentos en BHIA

Figura IV.5b

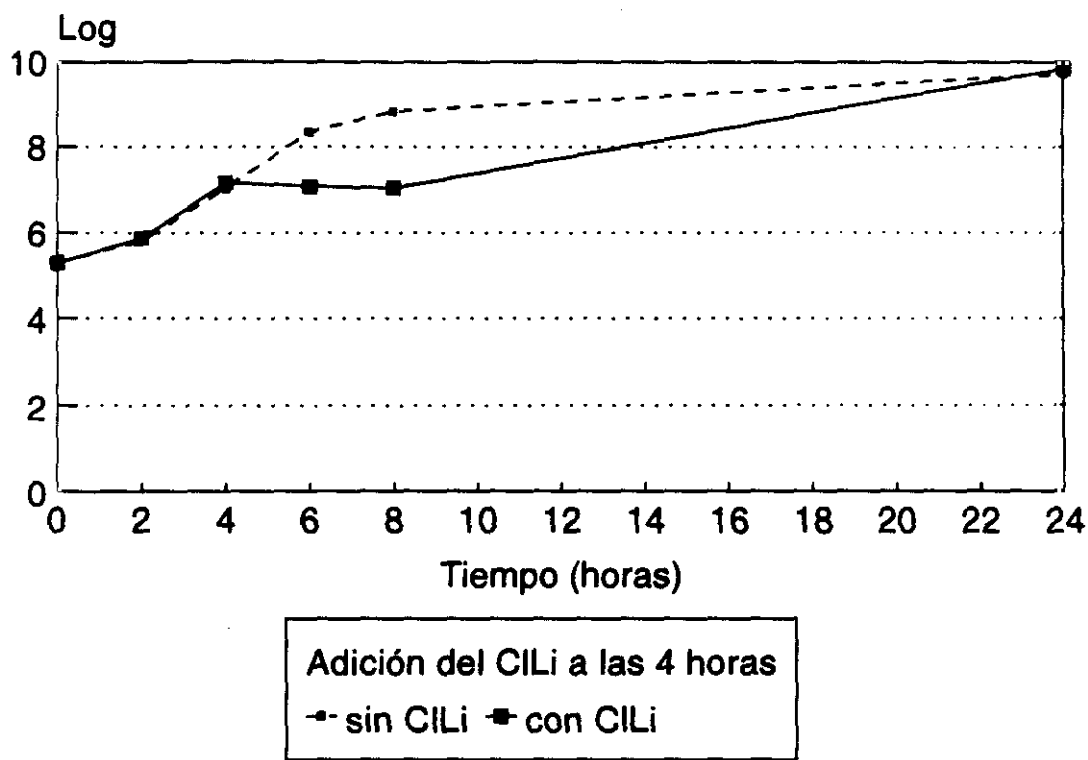


Adición del CILi a las 2 horas

— sin CILi * con CILi

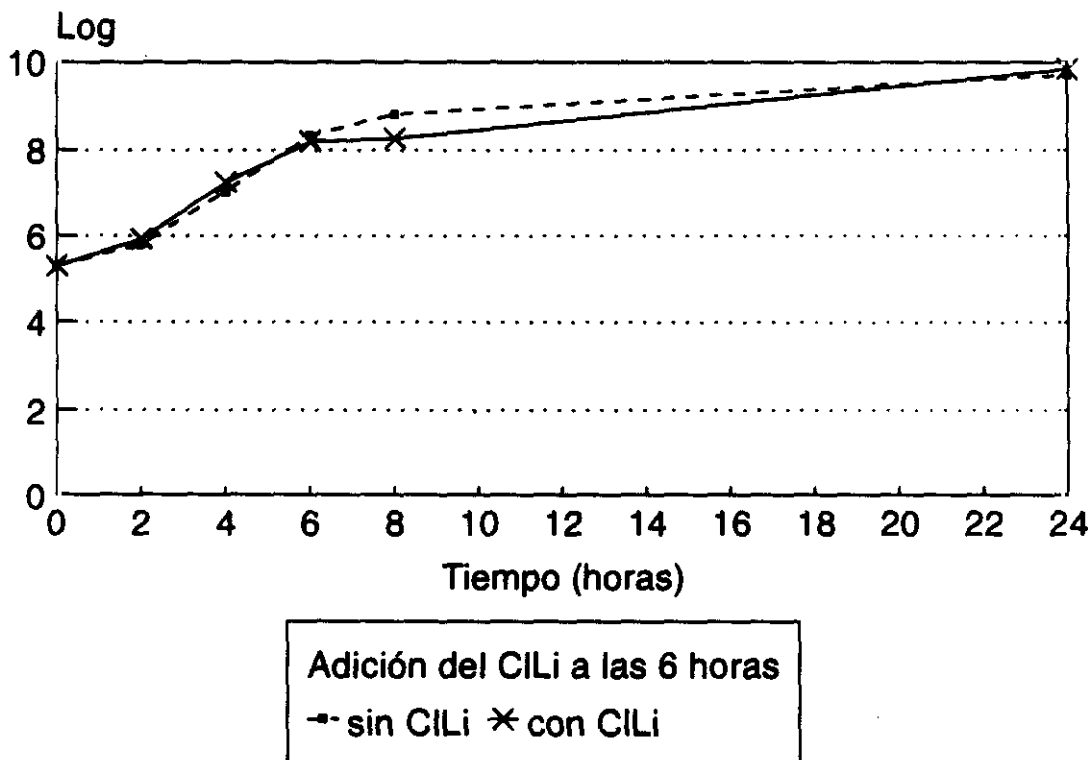
Recuentos en BHIA

Figura IV.5c



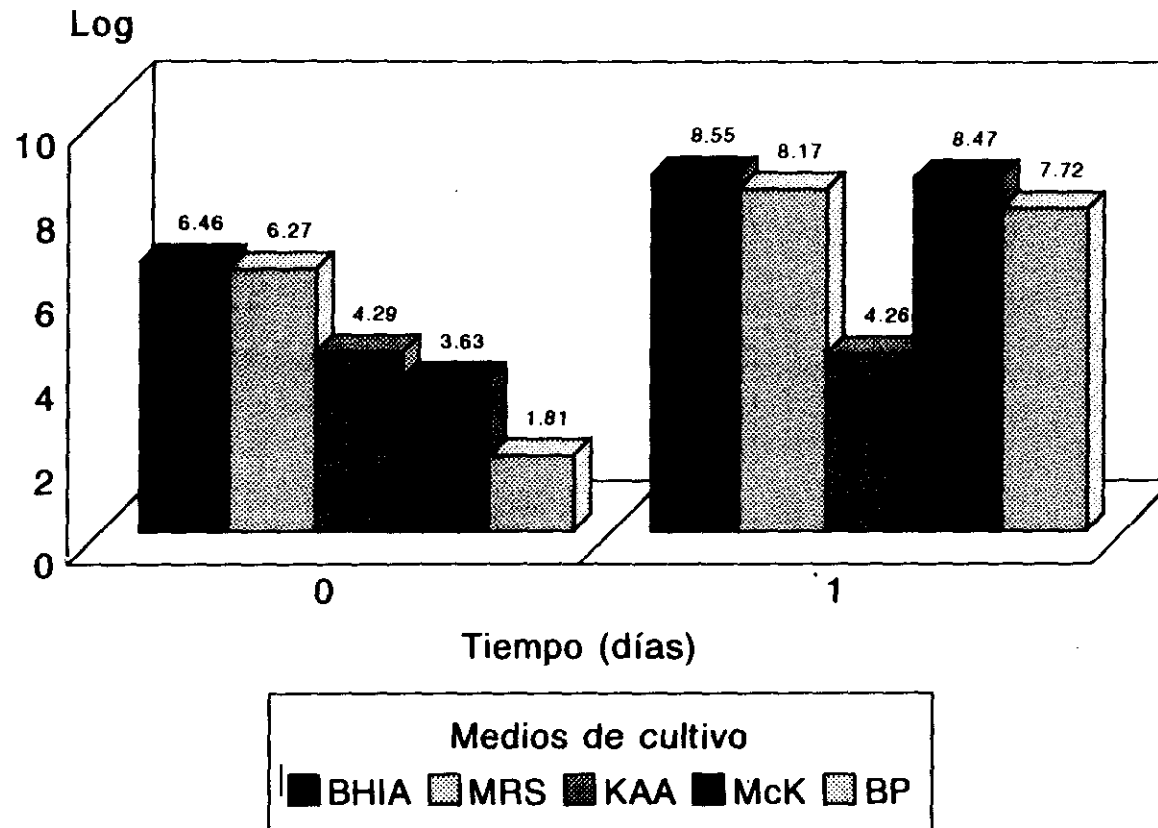
Recuentos en BHIA

Figura IV.5d



Recuentos en BHIA

Figura IV.6 Estimación de los principales grupos bacterianos del HA y su crecimiento tras 24 horas de incubación en BHI-CL.



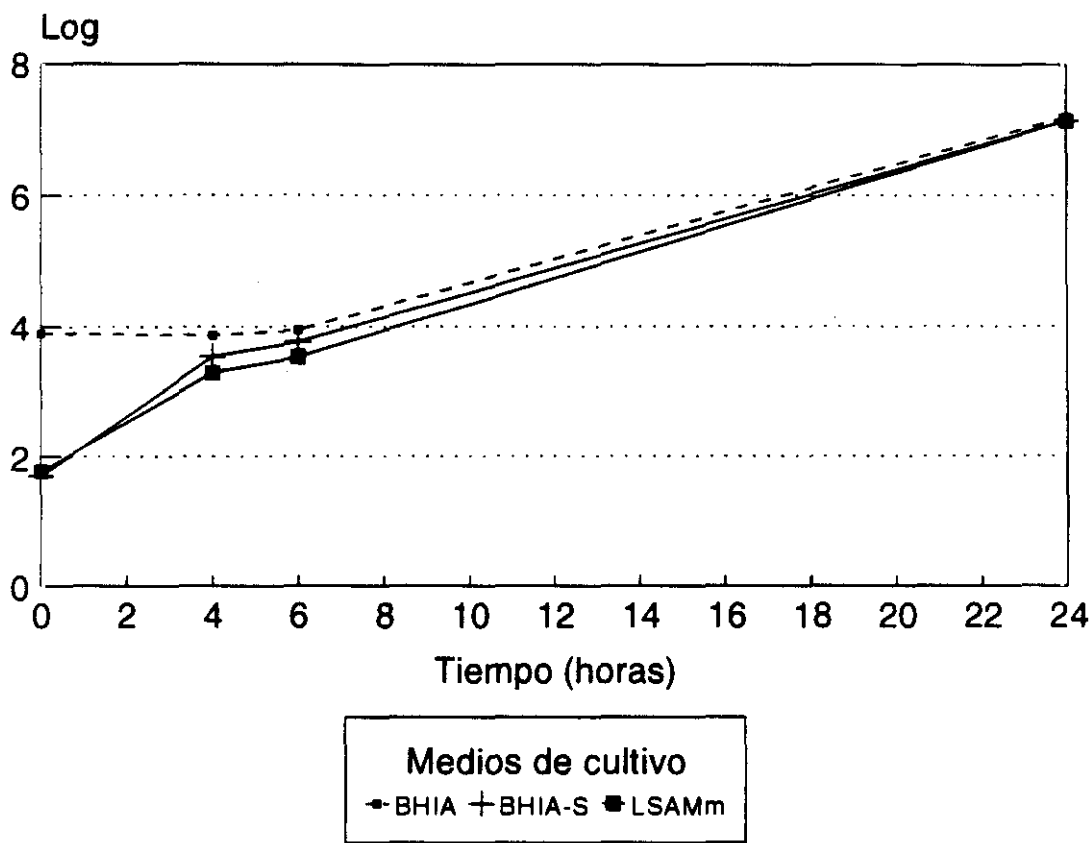
IV.D.2. Influencia del momento de la incorporación del CL sobre la reparación de *L. monocytogenes* dañada subletalmente por congelación

Ya hemos comentado anteriormente que algunos autores recomiendan la incubación de las muestras sospechosas de contener listerias dañadas subletalmente en un caldo no selectivo durante el periodo de reparación celular, haciendo posteriormente el caldo selectivo mediante la adición de compuestos inhibidores empleados habitualmente para el aislamiento de *Listeria*. Algunos autores, sin embargo, señalan que la reparación de las listerias lesionadas se podía ver dificultada por el crecimiento de otros microorganismos, como sería el caso de las muestras de alimentos (Mundt, 1986; Bailey y col., 1990; Busch y Donnelly, 1992). Decidimos, por tanto, comprobar la influencia que podría ejercer el momento de la adición del CL sobre la reparación de *L. monocytogenes* en BHI, tanto en cultivo puro, como en presencia de otros microorganismos.

Las experiencias realizadas sobre la adición de CL (concentración final de 1,5%) a un cultivo de listerias dañadas por congelación en BHI a diferentes tiempos durante el proceso de reparación, revelaron que la adición de este agente selectivo no tiene influencia apreciable sobre la reparación de estas bacterias (Figuras IV.7a y 7b). Así, la reparación de las células de *L. monocytogenes* dañadas subletalmente se completó en 6 horas, independientemente de que el CL se añadiera a las 0, 4 ó 6 horas de incubación. Por tanto, no es necesaria la incubación en un medio no selectivo si se emplea una concentración de CL que no impida la reparación de las células lesionadas, como es el 1,5% (Mendonca y Knabel, 1994).

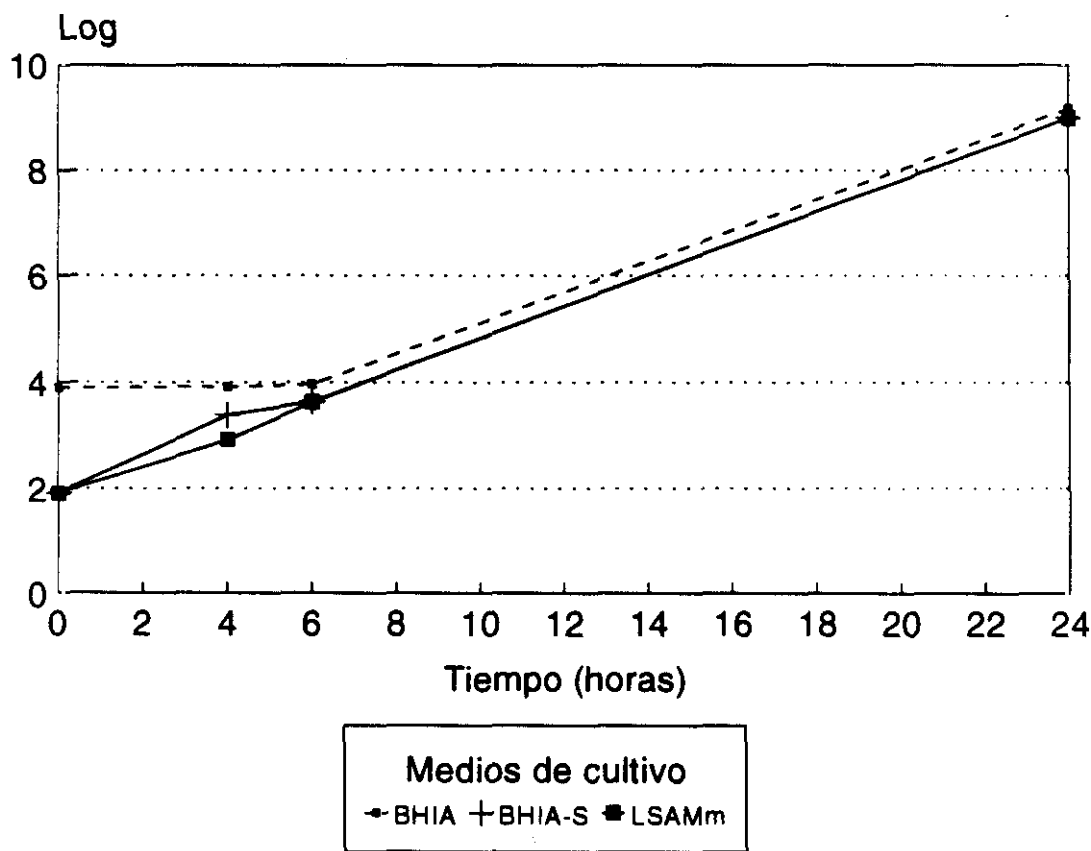
En cuanto a la reparación de *L. monocytogenes* dañada por congelación en presencia de otros microorganismos (recuento de mesófilos totales de aproximadamente 5 log/ml), todas las experiencias realizadas mostraron una reparación celular al cabo de las 6 horas de incubación, independientemente del momento de la adición del CL (Figuras IV.8a y 8b). Los recuentos obtenidos a las 24 horas, sin embargo, variaron en función de la cantidad de inóculo inicial. Así, cuando se empleó una concentración inicial media-baja de listerias viables totales (aproximadamente 4 log/ml), con un 90% de células dañadas, se alcanzaron unas concentraciones de *L. monocytogenes* de 8 log/ml en los casos en que se adicionó CL al cultivo, independientemente del momento de su incorporación (0 ó 4 horas), mientras que en BHI sin CL los valores se redujeron en casi 2 log.

Figura IV.7a Reparación y crecimiento de *L. monocytogenes* tras su congelación en BHI sin CILi.

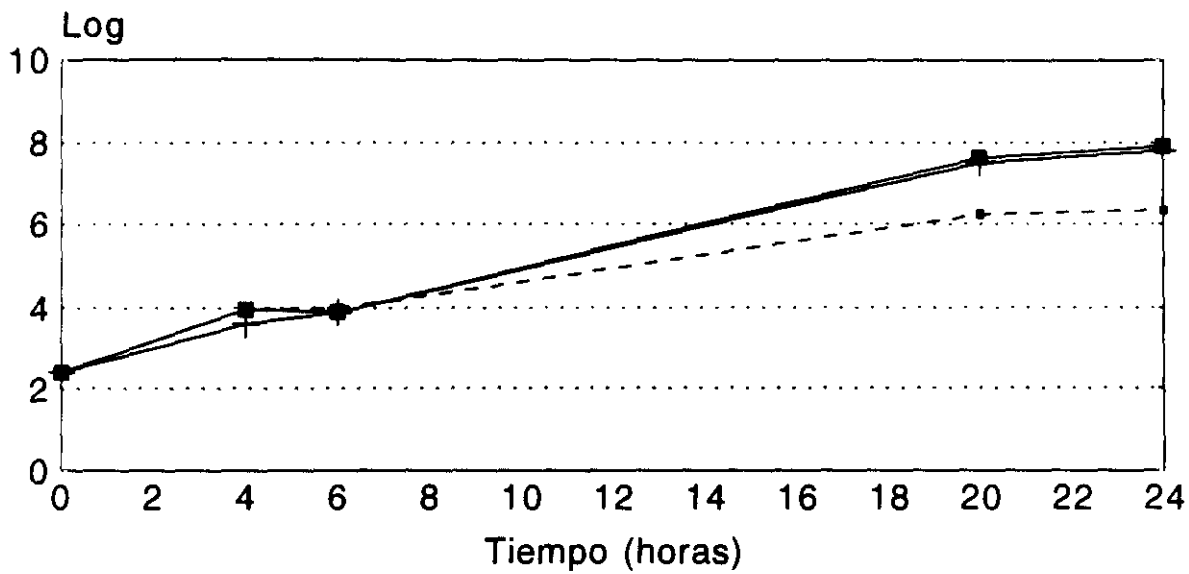


99% de listerias dañadas

Figura IV.7b Reparación y crecimiento de *L. monocytogenes* tras su congelación en BHI-CL. Adición de CILi a las 0 horas



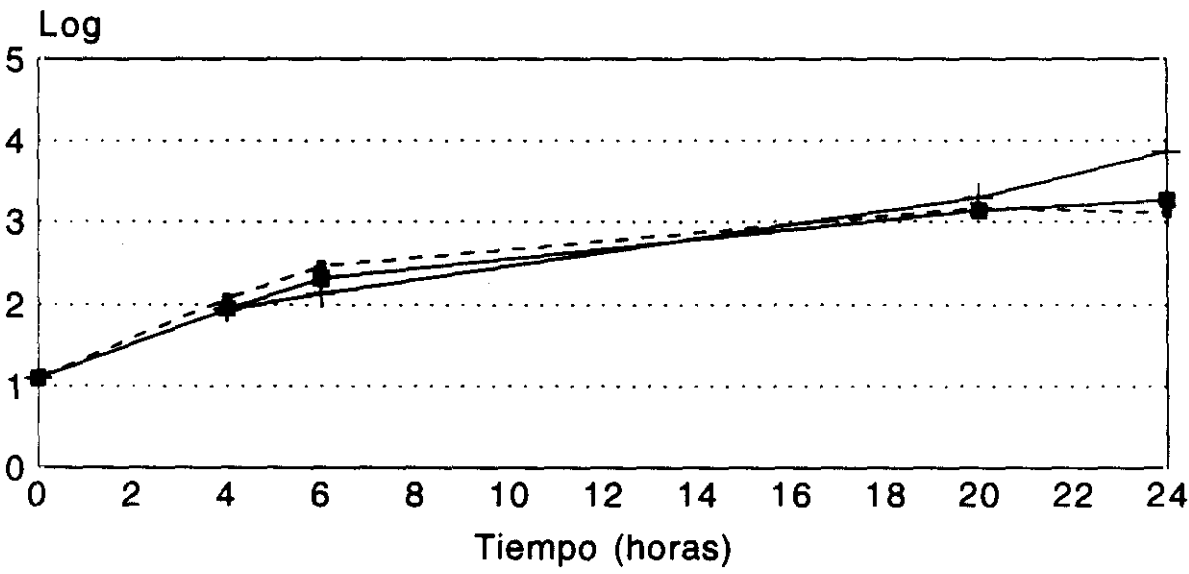
Reparación y crecimiento de *L. monocytogenes* dañada por congelación en BHI-CL en presencia de los microorganismos del HA. Adición de CILi a distintas horas.
Figura IV.8a



Horas de adición del CILi
- Sin CILi + (0 h) - (4 h)

Recuentos en LSAMm
Inóculo: 3,81 Log (90% de listerias dañadas subletalmente)

Figura IV.8b



Horas de adición del CILi
- Sin CILi + (0h) - (4h)

Recuentos en LSAMm
Inóculo: 2,14 Log (95,2% de listerias dañadas subletalmente)

Resultados parecidos obtuvieron Mendonca y Knabel (1994) empleando concentraciones de CL del 0,7-1%, logrando la recuperación de *L. monocytogenes* (concentración inicial de 4 log, 100% de listerias dañadas) hasta 7,4 log tras una incubación de 60 horas. Cuando la concentración inicial de listerias fue baja (unos 2 log/ml), con una proporción de células dañadas del 95,2%, los recuentos de *L. monocytogenes* a las 24 horas fueron apreciablemente menores, no llegando a alcanzar los 4 log/ml. En este caso, en los cultivos en que se había incorporado CL los valores alcanzados fueron mayores que en los cultivos sin CL, aunque la diferencia sólo fue notable en el caso en que el CL se incorporó a las 0 horas (una diferencia de 0,5 log respecto al cultivo sin CL).

La adición del CL al BHI, por tanto, a una concentración del 1,5%, no inhibe la reparación de las células de *L. monocytogenes* dañadas subletalmente por efecto de la congelación, favoreciendo, sin embargo, la recuperación de *L. monocytogenes* cuando se encuentra presente una gran cantidad de microorganismos. Esta mejor recuperación tras una incubación de 24 horas es mejor, incluso, considerando que el principal efecto inhibitorio del CL sobre los microorganismos presentes en los alimentos se ejerce sobre la población de los estreptococos, que son el grupo bacteriano que mayores problemas crea a la hora del aislamiento de *Listeria* a partir de alimentos (Buchanan, 1990; Cox y col., 1990; Mendonca y Knabel, 1994).

IV.E. INFLUENCIA DE DISTINTAS CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE LA RECUPERACION DE *L. monocytogenes* DAÑADA POR CONGELACION

Uno de los aspectos más discutidos en los procedimientos de cultivo de *L. monocytogenes* sometida a algún tipo de tratamiento subletal son las condiciones de la incubación, principalmente en lo que se refiere a la temperatura y a la disponibilidad de oxígeno. Por ello decidimos comprobar cómo podían influir las condiciones de incubación sobre la reparación y el crecimiento de *L. monocytogenes* dañada subletalmente por congelación en BHI-CL.

IV.E.1. Influencia de la incubación con y sin agitación

En las experiencias realizadas en BHI, con una concentración inicial de listerias media-baja (unos 4 log) y un alto porcentaje de células dañadas (99,5%), el tiempo de reparación de las listerias dañadas en BHI sin CL fue similar (entre 6 y 8 horas), siendo también comparables los valores de crecimiento a las 24 horas (alrededor de 9 log) (Figuras IV.9a y 9b). No se apreciaron, por tanto, ningún efecto de la incubación con y sin agitación en la reparación y el crecimiento de estas listerias dañadas en caldo no selectivo y en ausencia de otros microorganismos.

Respecto a las experiencias realizadas en presencia de los microorganismos del HA, hay que tener en cuenta que la concentración inicial de *L. monocytogenes* utilizada en ellas fue muy baja (unos 2 log/ml), estando el 99,9% de ellas dañadas, por lo que no fue posible el aislamiento de *L. monocytogenes* directamente en LSAMm (menos de 10 células no dañadas/ml). En conjunto, los resultados obtenidos en las experiencias realizadas en BHI, al igual que ocurrió en cultivo puro, no mostraron ninguna diferencia significativa entre las incubaciones realizadas con y sin agitación (Figura IV.10). Fue sorprendente, en este caso, el descenso de los recuentos a las 48 horas en ambas condiciones, llegando a no detectarse listerias en LSAMm al cabo de 7 días de incubación (Figura IV.10). A pesar de la gran proporción de flora ácido-láctica presente en el HA que podría haber producido un descenso del pH hasta unos valores inhibitorios para el crecimiento de *L. monocytogenes*, las medidas que realizamos reflejaron unos valores de pH que oscilaron alrededor de 6,0. Estos valores no son inhibitorios para el crecimiento de *L. monocytogenes*, dado que a temperaturas de incubación de 30°C *L. monocytogenes* es capaz de crecer a pH superiores de 4,5 (Parish y Higgins, 1989). Aunque no nos hemos detenido a investigar este aspecto, dado que no era el objeto principal de nuestro estudio, otra posible explicación a este hecho podría ser la liberación al medio de productos inhibidores de *Listeria* por parte del resto de los microorganismos, como la producción de bacteriocinas por parte de algunos enterococos que, al carecer el medio de CL, crecerían libremente (Mendonca y col., 1994).

En las experiencias realizadas en BHI-CL, los recuentos de listerias a las 24 horas en LSAMm fueron similares, y superiores a los obtenidos en BHI (4 log/ml) (Figura IV.10).

Figura IV.9a Reparación y crecimiento de *L. monocytogenes* en BHI con agitación.

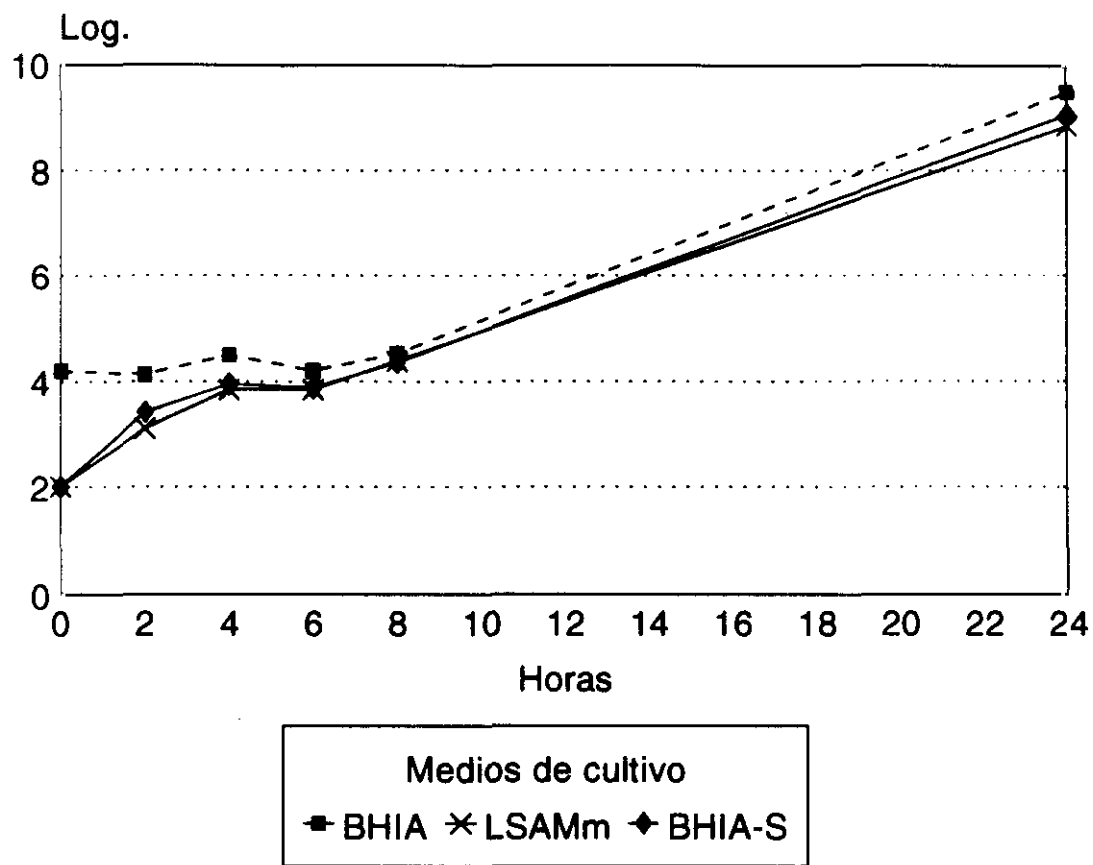
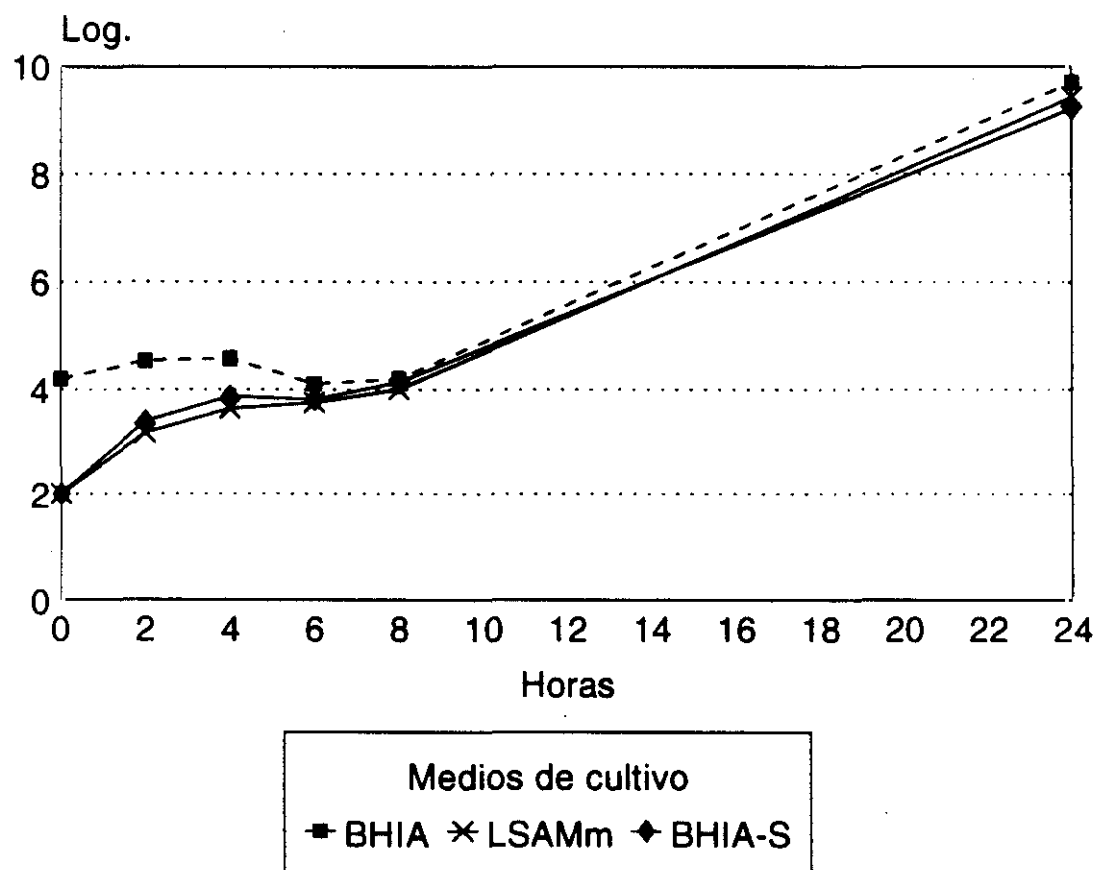


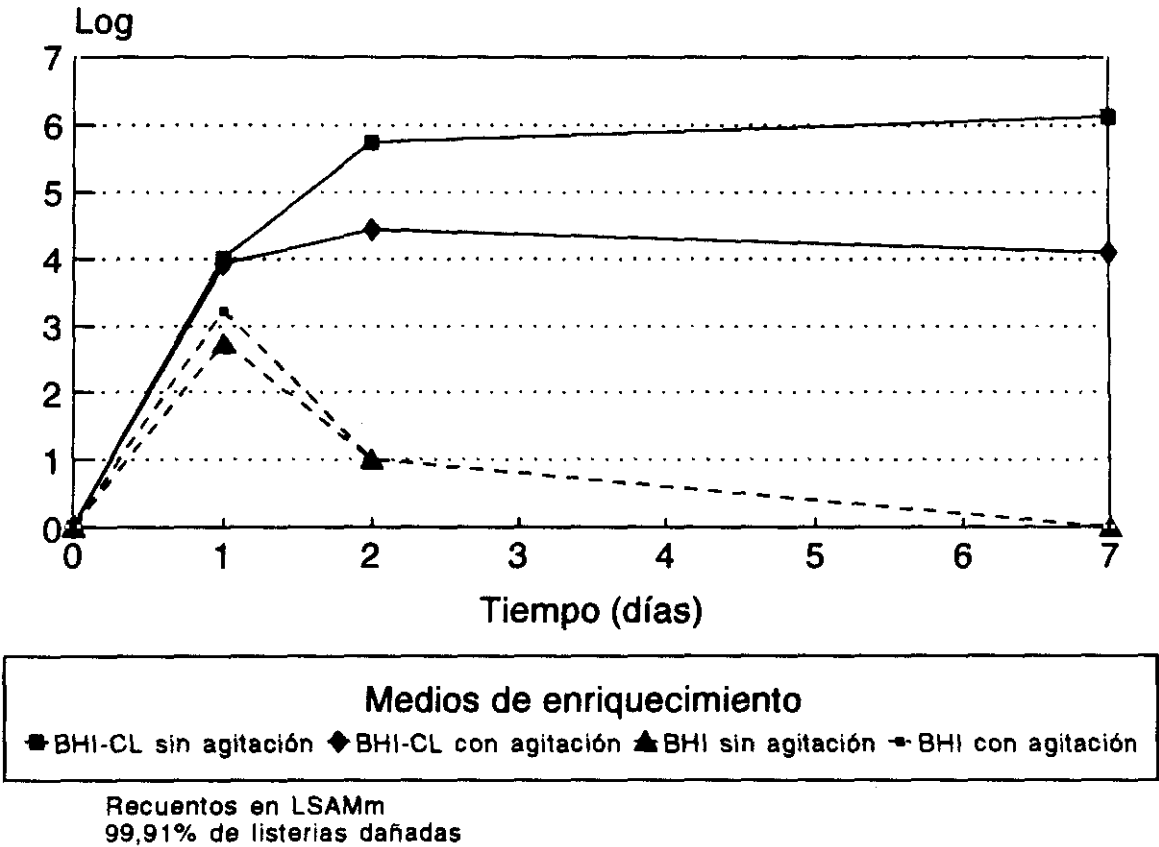
Figura IV.9b Reparación y crecimiento de *L. monocytogenes* en BHI sin agitación.



Sin embargo, tras 2 días de incubación, los valores que encontramos fueron significativamente mayores en el caso de incubación sin agitación (más de 1 log/ml), llegando a una diferencia de 2 log/ml al cabo de 7 días de incubación.

El crecimiento de los microorganismos del homogeneizado de alimentos, tanto en BHI como en BHI-CL, con agitación y en cultivo estático, resultó similar en todos los casos, experimentando un incremento de casi 2,5 log a las 24 horas de incubación, manteniéndose a partir de entonces los recuentos constantes hasta los 7 días de incubación.

Figura IV.10 Influencia de la agitación sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* dañada por congelación en BHI y BHI-CL en presencia de los microorganismos del HA.

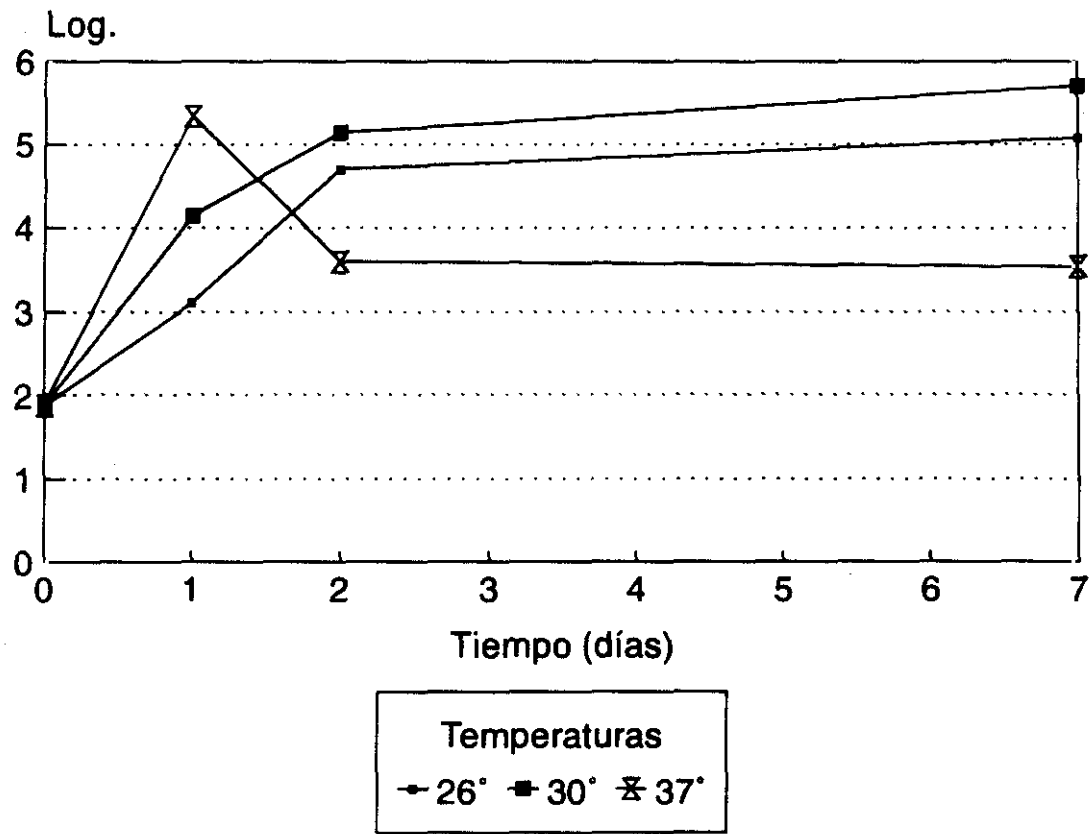


IV.E.2. Influencia de la temperatura de incubación

La temperatura de incubación es otro de los parámetros que habitualmente se ha considerado que influyen en la recuperación de las listerias a partir de los alimentos, tanto de células que no han sufrido ningún tipo de tratamiento, como en alimentos que han sufrido algún tratamiento térmico o congelación (Varabioff, 1990; Budu-Amoako y col.,1992; Martin y Katz, 1993). En este sentido, hemos estudiado la influencia que podría ejercer la incubación a temperaturas de 26, 28, 30, 34 y 37°C sobre la recuperación de *L. monocytogenes* dañada subletalmente por congelación.

A partir de una concentración inicial de listerias baja (unos 3 log/ml) con un porcentaje alto de células dañadas (94%), se observó que la recuperación de *L. monocytogenes* en BHI-CL varió en función de la temperatura y el tiempo de incubación (Figura IV.11). Así, los recuentos efectuados a las 24 horas de incubación revelaron que

Figura IV.11 Recuperación de *L. monocytogenes* tras su congelación en BHI-CL a diferentes temperaturas en presencia de los microorganismos del HA



la recuperación había sido significativamente mayor a 37°C, que a 30 y 26°C, con una diferencia de aproximadamente 1,5 log/ml con respecto a la incubación a 30°C y de más de 2 log/ml respecto a la incubación a 26°C. Sin embargo, tras 48 horas de incubación, no sólo no se mantuvo esta diferencia, sino que, además, los recuentos de la experiencia a 37°C sufrieron un gran descenso (2 log/ml), manteniéndose estables tras 7 días de incubación. La recuperación de las listerias a las 48 horas en las experiencias a 26 y 30°C fue sensiblemente mayor que a las 24 horas (más de 1 log/ml), aumentando ligeramente tras 7 días de incubación, en que alcanzaron unos valores de 5 y 5,7 log/ml respectivamente (Figura IV.11). Los resultados obtenidos de las experiencias realizadas a 28 y 34°C fueron similares a los encontrados a 26 y 37°C respectivamente.

Las experiencias realizadas en BHI sin CL a las diferentes temperaturas muestran comportamientos diferentes en cada uno de los casos con respecto a la recuperación en BHI. Así, a 26°C, los recuentos a las 24 horas son mayores en BHI, pero se mantienen constantes a lo largo de la incubación hasta 7 días. A 30°C la recuperación a las 24 horas es similar en BHI y BHI-CL, pero los recuentos experimentan un descenso, llegando a una diferencia de 3 log/ml en los valores obtenidos a los 7 días de incubación. Por último, a 37°C, las curvas de recuperación en BHI y BHI-CL fueron casi paralelas, estando siempre los recuentos en BHI al menos 0,7 log/ml por debajo de los obtenidos en BHI-CL (Figura IV.12a a 12c).

Algunos autores señalan la conveniencia de un periodo de incubación a temperaturas de refrigeración (4-7°C) para la recuperación de *L. monocytogenes* dañada subletalmente tanto por efecto del calor como de la congelación (Varabioff, 1990; McCarthy y col., 1990), señalando que el efecto inhibitor de estas temperaturas sobre el crecimiento de la microflora mesófila de los alimentos favorece la recuperación de las listerias dañadas. No obstante, el empleo de estas temperaturas tiene el inconveniente, al igual que ocurre con el tradicional enriquecimiento en frío para el aislamiento de *Listeria*, de requerir periodos más largos de incubación que a temperaturas superiores. Así, mientras la mayoría de los autores encuentran que a temperaturas entre 30-37°C la reparación de las listerias dañadas se completa entre las 4 y las 8 horas (Busch y Donnelly, 1992; Budu-Amoako y col., 1992; Martín y Katz, 1993), se recomienda un periodo de incubación de 3 a 7 días a temperaturas de refrigeración, siendo éste un periodo de pre-enriquecimiento, para pasar a un enriquecimiento posterior de la muestra a 30°C durante otros 2-7 días

Recuperación de *L. monocytogenes* tras su congelación en BHI y BHI-CL a diferentes temperaturas en presencia de los microorganismos del HA.

Figura IV.12a

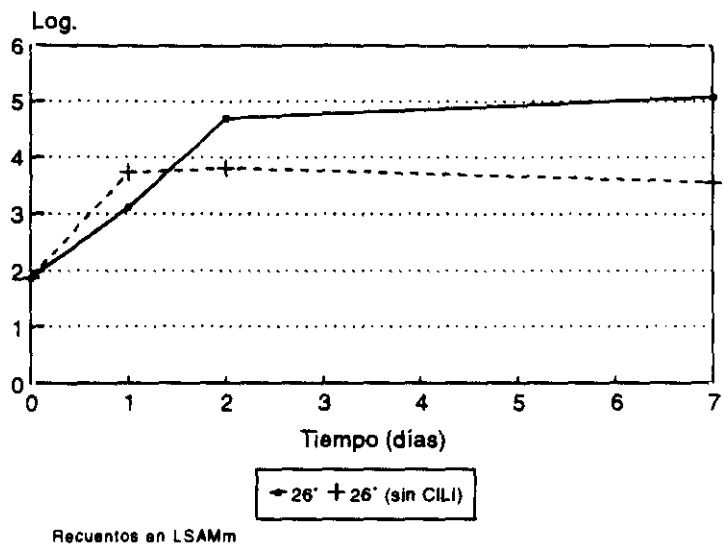


Figura IV.12b

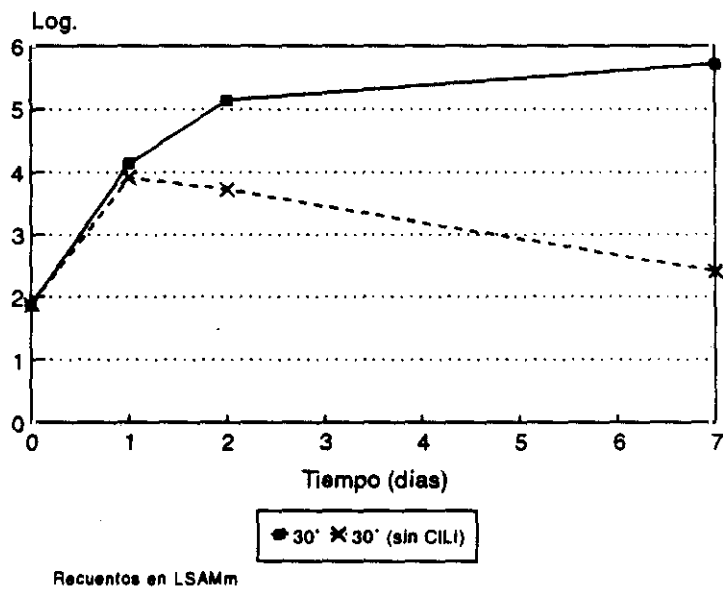
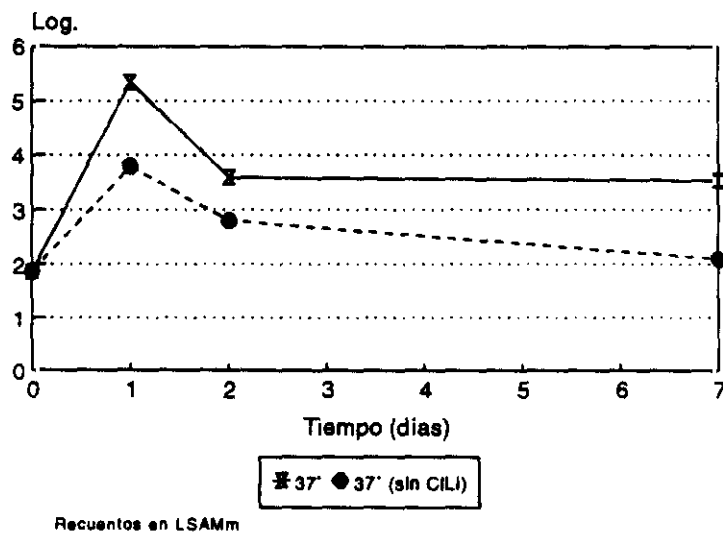


Figura IV.12c



(Varabioff, 1990; McCarthy, 1990). El empleo de temperaturas de refrigeración, por tanto no ofrece muchas ventajas cuando se dispone de un medio capaz de permitir una rápida reparación de las células dañadas subletalmente a temperaturas superiores en tan corto espacio de tiempo, inhibiendo simultáneamente el crecimiento de los enterococos, como hemos visto que sucede cuando se emplea el BHI-CL.

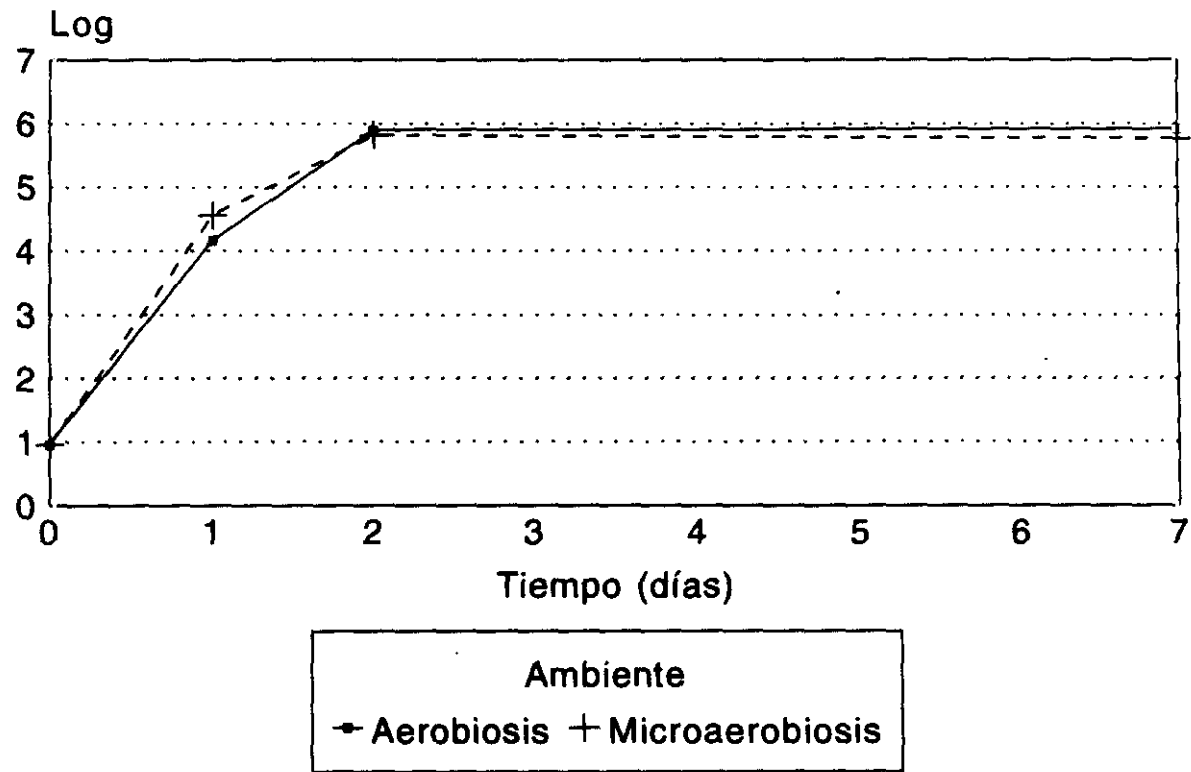
IV.E.3. Influencia de la disponibilidad de oxígeno

Estudios relativos a la recuperación de *L. monocytogenes* dañada subletalmente por efecto del calor indican que la reparación de estas células se favorece en ambiente de anaerobiosis (Busch y Donnelly, 1992; Mendonca y Knabel, 1994; Martin y Katz, 1993). Para comprobar si el mismo efecto tenía lugar cuando el daño celular era producido por efecto de la congelación, realizamos una serie de experiencias comparando el proceso de recuperación de células de *L. monocytogenes* dañadas por congelación en ambiente de aerobiosis y en microaerobiosis, comprobando si un descenso significativo del oxígeno disponible para las células podría acelerar el proceso de reparación. Realizado un análisis de varianza a partir de los resultados obtenidos con las distintas cepas de *L. monocytogenes* en ambos ambientes se concluyó que no existen diferencias significativas estadísticamente entre la incubación en aerobiosis y en microaerobiosis tanto en tiempos de incubación cortos (24-48 horas) como largos (7 días) (Figura IV.13).

Según indican algunos autores, el daño causado a una célula bacteriana por un tratamiento subletal puede llevar a la producción de formas reactivas de oxígeno, como peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radicales hidroxílicos, tóxicos para las células (Martin y Katz, 1993; Mendonca y Knabel, 1994). En el caso de un tratamiento por calor, las enzimas encargadas de detoxicar estos productos (catalasa y superóxido dismutasa) son destruídas por efecto de las altas temperaturas, por lo que la reparación de las células dañadas parece ser más efectiva en ausencia de oxígeno, o añadiendo agentes que neutralicen las formas reactivas, como piruvato o catalasa (Busch y Donnelly, 1992; Martin y Katz, 1993; Mendonca y Knabel, 1994). En el caso del daño subletal por frío, como es la congelación, no parece que se produzca la destrucción de estas enzimas detoxicantes, ya que el daño se produce de forma diferente (ver epígrafe I.C), no existiendo diferencias en la reparación y el crecimiento de estas bacterias a 30°C en BHI-CL tanto en presencia

de oxígeno como en su ausencia.

Figura IV.13 Recuperación de *L. monocytogenes* en BHI-CL en aerobiosis y microaerobiosis en presencia de otros microorganismos.



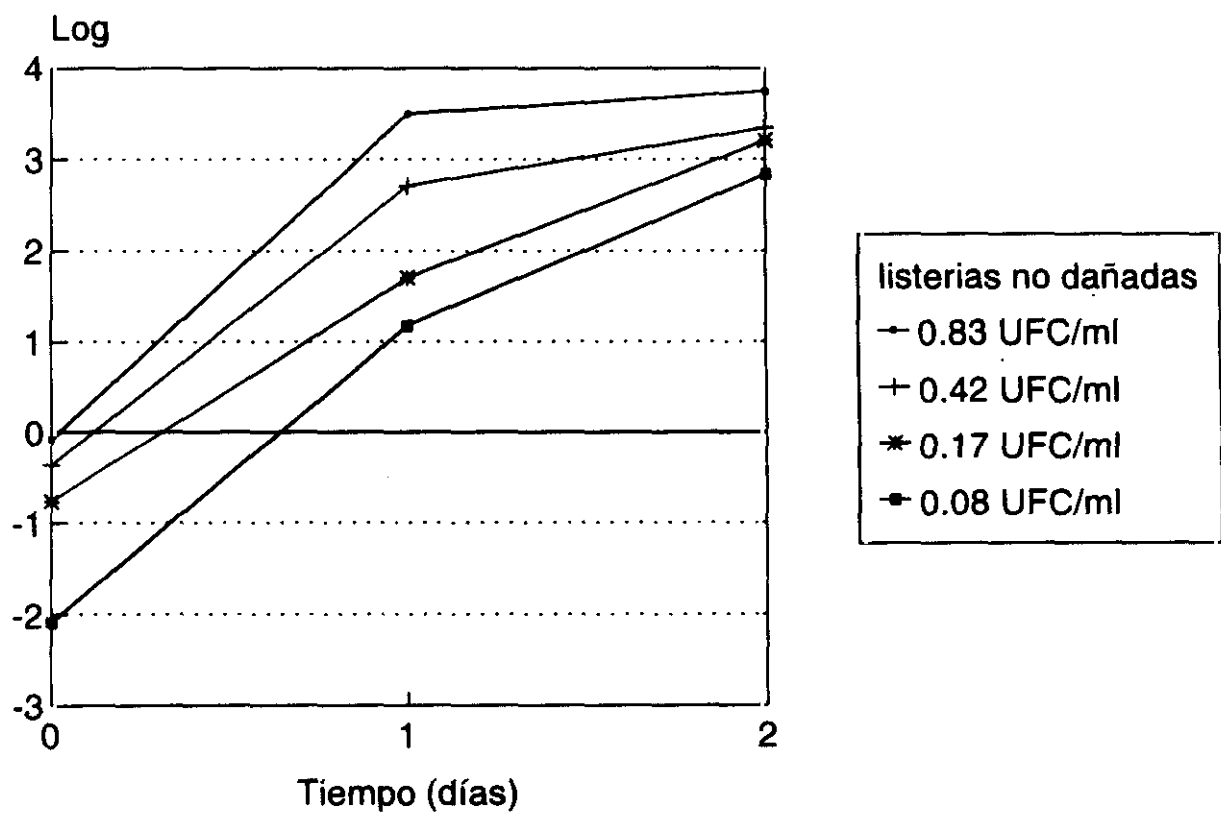
Recuentos en LSAMm
Inóculo: entre 0 y 2,3 log de listerias sanas (96,06% dañadas)

De acuerdo con los resultados obtenidos de todo este conjunto de experiencias, las condiciones óptimas para la recuperación de *L. monocytogenes* a partir de productos congelados serían la incubación en **BHI-CL en aerobiosis sin agitación a 30°C** durante un tiempo que oscilaría entre 6 horas si hemos encontrado listerias por aislamiento directo y 24 horas en el caso de aislamiento directo negativo.

IV.F. LIMITE DE DETECCION DE *L. monocytogenes* DAÑADA POR CONGELACION EN BHI-CL EN PRESENCIA DE OTROS MICROORGANISMOS

Utilizando las condiciones de incubación que acabamos de señalar, el BHI-CL mostró una gran efectividad para la reparación y el enriquecimiento de bajas cantidades de *L. monocytogenes* dañada por congelación. Así, tras 24 horas de incubación en BHI-CL se lograron obtener recuentos de *L. monocytogenes* en LSAMm incluso cuando la concentración inicial de listerias no dañadas era de 0,08 UFC/ml y la concentración total de microorganismos distintos de *Listeria* de 5 log/ml.

Figura IV.14 Recuperación de *L. monocytogenes* NCTC 7973 dañada por congelación en BHI-CL. (menos de 1 listeria no dañada/ml)



IV.G. EFICACIA DE DISTINTOS MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVOS PARA LA RECUPERACION DE LISTERIAS DAÑADAS SUBLETALMENTE POR CONGELACION EN PRESENCIA DE OTROS MICROORGANISMOS

Existe una gran discrepancia entre distintos autores sobre la utilidad de los medios de enriquecimiento utilizados habitualmente en los métodos de detección de *L. monocytogenes* (el caldo LEB propuesto por la FDA y el caldo UVM propuesto por la USDA) para la recuperación de listerias dañadas subletalmente (Bailey y col., 1990; Warburton y col., 1992; Busch y Donnelly, 1992; Budu-Amoako y col., 1992; Mendonca y Knabel, 1994). Esto nos llevó a comprobar la eficiencia del caldo BHI-CL en comparación con la de estos medios para la recuperación de listerias dañadas por congelación en muestras inoculadas y en alimentos congelados. Igualmente, incluimos en nuestro estudio el caldo PALCAM, descrito recientemente (Van Netten y col., 1989) con el fin de completar nuestros resultados.

A nivel experimental con muestras inoculadas, la recuperación de bajas cantidades (una media de 1,4 log/ml) de células de *L. monocytogenes* dañadas por congelación en presencia de gran cantidad de otros microorganismos (5 log/ml) tras 24 horas de incubación a 30°C fue muy similar en BHI-CL y PALCAM, llegando a unos recuentos de 4,5 y 4,7 log/ml respectivamente. Los valores obtenidos a partir de los medios LEB y UVM, sin embargo, fueron sensiblemente menores (2,15 y 3,32 log/ml respectivamente).

Los resultados obtenidos con respecto a la recuperación de *Listeria* en las muestras de alimentos congelados han sido muy dispares en función del tipo de alimento principalmente, aunque también existieron ciertas variaciones según el medio de enriquecimiento.

De las 10 muestras de helado procesadas, ninguna de ellas resultó positiva a *Listeria* por aislamiento directo en LSAMm ni tras el enriquecimiento (24 horas, 30°C) en ninguno de los caldos empleados. Aunque se ha descrito el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de helados, la incidencia, sin embargo es baja, así como los niveles de contaminación (Anónimo, 1987a; Walker y col., 1991).

Las pizzas precocinadas ultracongeladas son un producto que, dada su variada

composición, tienen altas probabilidades de sufrir una contaminación por *Listeria*, bien a partir de las materias primas (queso, embutidos, etc.) o bien durante el proceso de elaboración, habiéndose determinado una incidencia de *Listeria* en este producto del 40% (Saludes y Aguiar, 1994). De las 10 pizzas que analizamos en nuestro estudio, ninguna resultó positiva a *Listeria* por aislamiento directo, mientras que en 7 de ellas se aisló *Listeria* a partir de al menos uno de los cuatro medios de enriquecimiento. De las muestras positivas, *L. monocytogenes* se aisló como especie única en tres ocasiones, *L. innocua* en dos, y en otras dos muestras se aislaron ambas especies simultáneamente (Tabla IV.2).

La **carne picada** es otro alimento que presenta una elevada incidencia respecto a *L. monocytogenes* (ver tabla I.3.), siendo un producto que en numerosas ocasiones es congelado, bien en el establecimiento de venta, o en los hogares de los consumidores. De las muestras de carne picada y hamburguesas analizadas, dos de ellas (muestras correspondientes a carne picada de temera sin aditivos) resultaron positivas en el aislamiento directo en LSAMm, con unos niveles de contaminación de $3,5 \times 10^2$ y $5,0 \times 10^1$ UFC/g respectivamente. En ambos casos se determinó la hemólisis de las colonias y su identificación, correspondiendo los aislamientos a *L. innocua*. Tras el proceso de reparación-enriquecimiento, todas las muestras resultaron positivas a partir de todos los medios de enriquecimiento (Tabla IV.3). En ninguna de las muestras de carne analizadas se aisló una única especie de *Listeria*, siendo siete de ellas positivas a *L. monocytogenes* y *L. innocua*, dos a *L. monocytogenes* y *L. welshimeri*, e incluso en una de ellas se aislaron conjuntamente *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. seeligeri*.

Los mayores recuentos de listerias tras el proceso de reparación-enriquecimiento, tanto a partir de las muestras de pizza como de las de carne picada se obtuvieron a partir de BHI-CL y PALCAM, seguidos por el UVM y el LEB. No obstante, los resultados obtenidos a partir de un análisis de varianza realizado sobre todos los casos positivos encontrados concluyen que no existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre la capacidad de los medios de enriquecimiento empleados para la recuperación de *Listeria* spp. a partir de las muestras analizadas (Tablas IV.4 y IV.5). Hay que señalar, igualmente que el número de falsos negativos encontrados en los distintos medios, que fue de 3 casos en PALCAM, 2 en BHI-CL y 1 en LEB y UVM.

Algunos autores establecen una relación entre la capacidad de un caldo de

enriquecimiento para la recuperación de listerias dañadas subletalmente y su capacidad para mantener un pH estable; así, se ha señalado la escasa efectividad del LEB para la recuperación de listerias lesionadas, atribuyéndola al descenso de pH que se produce en el medio al ser inoculado con una muestra que contiene una gran carga de otros microorganismos (Warburton y col., 1992; Budu-Amoako y col., 1992). Según nuestras experiencias, aunque los valores de pH encontrados en LEB inoculado con muestras de pizza resultó apreciablemente menor que en el resto de los caldos, en el caso de las muestras de carne, el pH fue menor en PALCAM, no habiendo apreciado, por tanto, esta relación.

Un hecho de gran importancia es que en la mayoría de las muestras no se aisló una única especie de *Listeria*, sino al menos dos especies distintas, siendo siempre *L. monocytogenes* una de las presentes en estos aislamientos mixtos (Tablas IV.4 y IV.5). El aislamiento de varias especies simultáneamente a partir de una muestra de alimento ha sido posible mediante la combinación de un medio líquido que ha permitido el crecimiento de las listerias presentes en las muestras hasta unos niveles detectables, junto con un medio altamente selectivo para *Listeria* (LSAMm) y el empleo de una técnica que permite diferenciar por la hemólisis de las colonias las especies de listerias presentes sobre el mismo medio de aislamiento, pudiendo efectuar así, incluso una estimación de la proporción de las diferentes especies de *Listeria* presentes en una muestra (Tablas IV.4 y IV.5).

TABLA IV. 2. DETECCION DE *Listeria* spp. EN PIZZAS CONGELADAS EN DISTINTOS MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO. N° DE MUESTRAS POSITIVAS EN CADA MEDIO

Especie detectada	BHI-CL	LEB	UVM	PALCAM	TOTAL
<i>Listeria</i> spp.	5	6	6	4	7
<i>L. monocytogenes</i>	1	2	2	3	3
<i>L. innocua</i>	2	2	2	0	2
<i>L. m.</i> + <i>L. i.</i>	2	2	2	1	2

L. m. : *L. monocytogenes*
L. i. : *L. innocua*

TABLA IV.3. DETECCION DE *Listeria* spp. EN CARNES CONGELADAS EN DISTINTOS MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO. N° DE MUESTRAS POSITIVAS EN CADA MEDIO

Especie detectada	BHI-CL	LEB	UVM	PALCAM	TOTAL
<i>Listeria</i> spp.	10	10	10	10	10
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	1	-	-
<i>L. m.</i> + <i>L. i.</i> *	7	7	6	7	7
<i>L.m.</i> + <i>L. w.</i>	2	2	2	2	2
<i>L. m.</i> + <i>L. i.</i> + <i>L. s.</i>	1	1	1	1	1

L. m. : *L. monocytogenes*
L. i. : *L. innocua*
L. s. : *L. seeligeri*

* En tres casos se identificó *L. monocytogenes* (API-*Listeria*), pero al no ser hemolíticas, se han incluido como *L. innocua*.

TABLA IV. 4. RECUPERACION DE *Listeria* spp. A PARTIR DE PIZZAS CONGELADAS EN DISTINTOS MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO

Medios	<i>Listeria</i> spp. (Log)	<i>L. monocytogenes</i>		<i>L. innocua</i>	
		Log	%	Log	%
BHI-CL	6,04	5,04	10	6,0	90
	5,03	-	-	5,03	100
	-	-	-	-	-
	5,87	5,87	100	-	-
	-	-	-	-	-
	4,9	4,5	39	4,7	61
	6,47	-	-	6,47	100
LEB	3,38	3,28	80	2,7	20
	3,7	-	-	3,7	100
	4,11	4,11	100	-	-
	6,08	6,08	100	-	-
	-	-	-	-	-
	2,58	1,6	10,3	2,53	89,7
	4,23	-	-	4,23	100
UVM	3,34	2,6	18	3,25	82
	3,25	-	-	3,25	100
	4,9	4,9	100	-	-
	5,17	5,17	100	-	-
	-	-	-	-	-
	4,85	4,5	43,3	4,61	56,7
	3,17	-	-	3,17	100
PALCAM	4,77	4,62	71,4	4,23	28,6
	-	-	-	-	-
	4,97	4,97	100	-	-
	5,84	5,84	100	-	-
	2,84	2,84	100	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-

TABLA IV.5. RECUPERACION DE *Listeria* spp. A PARTIR DE CARNES CONGELADAS EN DISTINTOS MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO

Medios	<i>Listeria</i> spp. (Log)	<i>L. monocytogenes</i>		Otras listerias	
		Log	%	Log	%
BHI-CL	6,04	5,39	22,1	5,94	79,9 (1a)
	4,34	4,14	62	4,92	38 (2)
	5,55	5,27	53	5,23	47 (2)
	4,04	3,7	44,5	3,78	55,5 (3)
	6,17	5,64	29,2	6	70,8 (3)
	5,25	4,84	38	5,04	62 (2)
	3,93	2,84	8	3,9	92 (2)
	5,78	3,55	0,6	5,77	99,4 (4)
	3,46	2,9	27,6	3,32	72,4 (4)
	3,55	2,9	21,7	3,44	78,3 (4)
LEB	4,9	4,08	15	4,83	85 (1b)
	3,14	2,92	57,2	2,8	42,8 (2)
	4,65	4,53	76	4,04	24 (2)
	4,94	4,7	58	4,57	42 (3)
	4,47	4,43	91,4	3,47	8,6 (3)
	2,0	1,7	50	1,7	50 (2)
	2,38	1,6	16,6	2,3	83,4 (2)
	3,9	2,9	10,2	3,84	89,8 (4)
	1,95	1,3	22,2	1,84	77,8 (4)
	2,9	1,54	43,7	1,65	56,3 (4)

(1a) *L. innocua* (60,2%) + *L. seeligeri* (17,7%)

(1b) *L. innocua* (30,0%) + *L. seeligeri* (55,5%)

(2) *L. innocua*

(3) *L. welshimeri*

(4) *L. monocytogenes* (según API-*Listeria*) no hemolítica (¿*L. innocua*?)

TABLA IV.5. (cont.) RECUPERACION DE *Listeria* spp. A PARTIR DE CARNES CONGELADAS EN DISTINTOS MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO

Medios	<i>Listeria</i> spp. (Log)	<i>L. monocytogenes</i>		Otras listerias	
		Log	%	Log	%
UVM	4,54	3,87	21,6	4,44	78,4 (1a)
	3,7	3,64	85,3	2,87	14,7 (2)
	4,61	4,4	61	4,2	39 (2)
	3,7	3,17	29	3,54	71 (3)
	4,84	4,6	57	4,47	43 (3)
	4,04	3,58	34,5	3,85	65,5 (2)
	4,87	4,34	30,4	4,71	69,6 (2)
	3,92	2,3	2,4	3,91	97,6 (4)
	2,32	2,32	100	-	-
	1,84	1,6	57,1	1,47	42,9 (4)
PALCAM	6,27	6,08	65,2	5,81	34,8 (1b)
	6,91	5,3	2,4	6,9	97,6 (2)
	7,41	7,36	87,5	6,5	12,5 (2)
	7,58	7,46	77,7	6,93	22,3 (3)
	7,62	7,14	32,6	7,44	67,4 (3)
	8,04	7,86	66,3	7,57	33,7 (2)
	2,61	1,84	17	2,53	83 (2)
	4,3	3,0	0,5	4,3	99,5 (4)
	1,84	1,77	85,7	1,0	14,3 (4)
	3,14	2,62	30	3,0	70 (4)

(1a) *L. innocua* (24,3%) + *L. seeligeri* (54,1%)

(1b) *L. innocua* (8,70%) + *L. seeligeri* (26,1%)

(2) *L. innocua*

(3) *L. welshimeri*

(4) *L. monocytogenes* (según API-*Listeria*) no hemolítica (¿*L. innocua*?)

CONCLUSIONES

1. Los factores que influyen en la supervivencia y el daño celular de una suspensión de *L. monocytogenes* sometida a congelación son la concentración inicial de bacterias en la suspensión, y el número de ciclos de congelación/descongelación que se aplican. La muerte y el daño celulares son mayores al disminuir la concentración bacteriana y aumentar el número de ciclos de congelación/descongelación aplicados
2. Los medios de aislamiento selectivos para *Listeria* LSAMm, PALCAM, OXFORD y LPM no muestran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su capacidad para la recuperación de *L. monocytogenes* dañada subletalmente por efecto de la congelación.
3. Todas las cepas de *Listeria* dañadas subletalmente por efecto de la congelación mostraron un tiempo de reparación celular de aproximadamente seis horas, tanto en BHI como en BHI suplementado con cloruro de litio a una concentración del 1,5%, incubados a una temperatura de 30°C.
4. Las condiciones de aerobiosis/microaerobiosis y el cultivo en agitación/estático no influyen en la recuperación de *L. monocytogenes* dañada por efecto de la congelación, aunque sí ejerce cierta influencia la temperatura de incubación, siendo óptima una temperatura de 30°C.
5. Una metodología a seguir que permite la recuperación de células de *L. monocytogenes* dañadas por efecto de la congelación es la incubación en BHI suplementado con cloruro de litio a una concentración del 1,5% a una temperatura de 30°C sin agitación en aerobiosis durante 24 horas. Este método permite recuperar cantidades muy bajas de listerias dañadas incluso en presencia de gran cantidad de otros microorganismos.
6. Los medios de enriquecimiento selectivos para *Listeria* LEB, UVM y PALCAM, así como el BHI-CL (BHI + cloruro de litio al 1,5%) no presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la recuperación de listerias a partir de productos comerciales congelados.

BIBLIOGRAFIA

AL-GHAZALI; M.R.; S.K. AL-AZAWI (1986). Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in a sewage treatment plant in Iraq. J. Appl. Bacteriol. 60, 251-254.

ANONIMO (1987a). More cheeses, ice cream linked to possible *Listeria*. Food Chem. News. 29 (11), 31.

ANONIMO (1987b). FDA's dairy product safety initiatives- 2nd year status report. Milk safety branch, Division of Cooperative Programs, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug administration, Washington D.C., 1-4.

ANONIMO (1991). Detection and evaluation of *Listeria monocytogenes*. Food Tech. 3/4, 31-34

BAILEY, J.S.; D.L. FLETCHER; N.A. COX (1990). Efficacy of enrichment media for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 53, 473-477.

BANNERMAN, E.S.; J. BILLE (1988). A new selective medium for isolating *Listeria* spp. from heavily contaminated material. Appl. Environ. Microbiol. 54 (1), 195-167.

BARTHA, R.; R. DIETRICH; G. TERPLAN (1992). Immunological techniques for the detection of *Listeria* spp. using monoclonal antibodies against hemolysin. Resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis, 145-146. Copenague, Dinamarca.

BARZA, M. (1985). Listeriosis and milk. New England J. Med. 312 (7), 438-440.

BEARNS, R.E.; K.F. GIRARD (1959). On the isolation of *Listeria monocytogenes* from biological specimens. Am. J. Med. Tech. 25, 120-126.

BECKERS, H.J.; P.S.S. SOENTERO; E.H.M. DELFGOU-VAN ASCH (1987). The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. Int. J. food Microbiol. 249-256.

BEERENS, H.; M.M. TAHON-CASTEL (1966). Milieu a l'acide nalidixique pour l'isolement des streptocoques, *K. pneumoniae*, *Listeria*, *Erysipelothrix*. Ann. Inst. Pasteur. 110, 90.

BENKERROUM, N; W.E. SANDINE (1988). Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes* J. Dairy Sci. 71, 3237-3245.

BERRANG, M.E.; R.E. BRACKETT; L.R. BEUCHAT (1989). Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. J. Food Prot. 52, 702-705.

BESSESEN, M.T.; Q. LUO; H.A. RORTBAT; M.J. BLASER, M.J.; R.T.III. ELLISON (1990). Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polimerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 56 (9), 2930-2932.

BEUCHAT, L.R.; M.E. BERRANG; R.E. BRACKETT (1990). Presence and public health implications of *Listeria monocytogenes* on vegetables. En "Foodborne listeriosis" (A.J. Miller, J.. Smith and G.A. Somkuti, eds.), 117-124. Elsevier, Amsterdam.

- BILLE, J. (1988). Epidemiology of human listeriosis in Europe. Comprehensive Conference on *Listeria monocytogenes* of the SIM. Red Lion Inn, California, USA.
- BIRCH, N.J. (1974). Lithium- and magnesium-dependent enzymes. *Lancet* ii, 965-966.
- BLANCO, M.C. (1993). El análisis oficial de los alimentos en relación con *Listeria monocytogenes*. En "*Listeria en alimentos*", 135-138. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
- BLANCO, M.M.; J.F. FERNANDEZ-GARAYZABAL; L. DOMINGUEZ; V. BRIONES; J.A. VAZQUEZ-BOLAND; J.L. BLANCO; J.A. GARCIA; G. SUAREZ (1989). A technique for the direct identification of haemolytic-pathogenic *Listeria* on selective plating media. *Letters Appl. Microbiol.* 9, 125-128.
- BLENDEN, D.C.; F.T. SZATALOWICZ (1987). Ecologic aspects of listeriosis. *J. Am. Vet. Med. Assn.* 151, 1761.
- BOERLIN (1991). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42 (1), 69-73.
- BOTTARI, D.A.; C.D. EMMETT; D. RODRIGUEZ; K.M. KEOUGH; G.W. WHIPPIE; G.W. DURBIN; M.A. MOZOLA; G.N. REYNOLDS (1992). Detection of *Listeria* in foods and environmental samples using DNA hybridization. Resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis, 151-152. Copenague, Dinamarca.
- BREED, R.S.; E.G.D. MURRAY; N.T. SMITH (1957). En "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*", 7th edit., 597-599. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- BREER, C. (1986). Das vorkommen von listerien in Kaese. Resúmenes del 2nd Congress in Foodborne Infections and Intoxications. Vol. 1, 230-233. Berlín, Alemania.
- BRIONES, V. (1992). Estudio de un método indirecto para el diagnóstico de la listeriosis. Tesis doctoral. Ed. Universidad Complutense, Madrid.
- BRIONES, V. (1993). Factores del hospedador que determinan la susceptibilidad a la listeriosis. En "*Listeria en alimentos*", 95-100. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
- BROWN, M.H. (1993). Microbiological aspects of frozen foods. En "*Food freezing: today and tomorrow*" (W.B. Bald, ed.). Springer-Verlag. London, UK.
- BUBERT, A.; W. GOEBEL (1992). Rapid genus- and species- specific identification of *Listeria* by polymerase chain reaction (PCR). Resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis, 153-154. Copenague, Dinamarca.
- BUCHANAN, R.L. (1990). Advances in cultural methods for the detection of *Listeria monocytogenes* En "*Foodborne listeriosis*" (A.J. Miller, J.. Smith and G.A. Somkuti, eds.), 85-95. Elsevier, Amsterdam.
- BUCHANAN, R.L.; H. STAHL; D.L. ARCHER (1987). Improved plating media for

simplified, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Food Microbiol. 4, 269-275.

BUCHANAN, R.L.; J.L. SMITH; H.G. STAHL; D.L. ARCHER (1988). *Listeria* methods development research at the Eastern Regional Research Center, US Department of Agriculture. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71 (3), 651-654.

BUCHANAN, R.L.; STAHL, H.G.; BENCIVENGO, M.M.; CORRAL, F. (1989). Comparison of lithium-chloride-phenilethanol-moxalactam and modified Vogel-Johnson agars for detection of *Listeria* spp. in retail-level meats, poultry and seafood. Appl. Environ. Microbiol. 55, 599-603.

BUDU-AMOAKO, E.; S. TOORA, R.F. ABLETT; J. SMITH (1992). Evaluation of the ability of primary selective enrichment to resuscitate heat-injured and freeze-injured *Listeria monocytogenes* cells. Appl. Environ. Microbiol. 58 (9), 3177-3179.

BUNNING, V.K.; R.G. CRAWFORD, J.G. BRADSHAW; J.T. PEELER; J.T. TIERNEY; R.M. TWEDT (1986). Thermal resistance of intracellular *Listeria monocytogenes* cells suspended in raw bovine milk. Appl. Environ. Microbiol. 52, 1398.

BUSCH, S.V.; DONNELLY, C.W. (1992). Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Appl. Environ. Microbiol. 58 (1), 14-20.

BUTMAN, B.T.; M.C. PLANCK; R.J. DURHAM; J.A. MATTINGLY (1988). Monoclonal antibodies which identify a genus-specific *Listeria* antigen. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1564-1569.

CANTONI, C.; M. VALENTI; G. COMI (1988). *Listeria* in formagi e in salumi. Industrie Alimentari. 27, 859-861.

CASSIDAY, P.K.; R.E. BRACKETT (1989). Methods and media to isolate and enumerate *Listeria monocytogenes*: a review. J. Food Prot. 52 (3), 207-214.

COLLINS, C.M.; P.M. LYNE (1984). En "Microbiological Methods", 5th ed., 352. Butterworths, London, UK.

COLLINS, M.D.; S.WALLBANKS; D.J. LANE; J. SHAH; R. NIETUPSKI; SMIDA, J.; M. DORSCH; E. STACKEBRANDT (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. Int. J. Syst. Bacteriol. 41 (2), 240-246.

COTTIN, J.; H. GENTHON; C. BIZON, B. CARBONELLE (1985). Recherche de *Listeria monocytogenes* dans des viandes prélevées sur 514 bovins. Sci. Aliments. 5 (IV), 145-149.

COX, L.J.; D. DOOLEY; R. BEUMER (1990) Effect of lithium chloride and other inhibitors on the growth of *Listeria* spp. Food Microbiol. 7 311-325.

CURTIS, G.D.W.; R.G. MITCHELL; A.F. KING; E.J. GRIFFIN (1989). A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Letters Appl. Microbiol. 8,

DATTA, A.R.; B.A. WENTZ; W.E. HILL (1987). Detection of hemolytic *Listeria monocytogenes* by using DNA colony hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 53 (9), 2256-2259.

DATTA, A.R.; WENTZ, B.A.; SHOOK, D.; TRUKSESS, M.W. (1988). Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes for detection of *Listeria monocytogenes* Appl. Environ. Microbiol. 54 (12), 2933-2937.

DATTA, A.R.; M.A. MOORE; B.A. WENTZ; J. LANE (1993). Identification and enumeration of *Listeria monocytogenes* by nonradioactive DNA probe colony hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 59 (1), 144-149.

DESPIERRES, M. (1971). Isolation of *Listeria monocytogenes* in a medium inhibitory to *Streptococcus faecalis*. Ann. Inst. Pasteur. 121, 493-501.

DIJKSTRA, R.G. (1982). The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents of canals of a sewage treatment plant. Zbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg. Abts. I. Orig B. 176, 202.

DOMINGO, M.; A.J. MARCO; N. PRATS; J. ALTIMIRA (1993). Patogenia y patología comparada de la listeriosis. En "*Listeria* en alimentos", 157-162. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

DOMINGUEZ, L. (1984). Aislamiento e identificación microbiana en el género *Listeria* (Pirie, 1940). Tesis doctoral. Ed. Universidad Complutense, Madrid.

DOMINGUEZ, L.; J.F. FERNANDEZ-GARAYZABAL; E.F. RODRIGUEZ-FERRI (1984). New methodology for the isolation of *Listeria* microorganisms from heavily contaminated environments. Appl. Environ. Microbiol. 52, 689-695.

DOMINGUEZ, L.; J.F. FERNANDEZ-GARAYZABAL; J.A. VAZQUEZ-BOLAND; E.F. RODRIGUEZ-FERRI; G. SUAREZ (1985). Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* à partir de lait cru destiné à la consommation humaine. Can. J. Microbiol. 31, 938-941.

DOMINGUEZ, L.; J.F. FERNANDEZ-GARAYZABAL; M. BLANCO; V. BRIONES; J.A. VAZQUEZ-BOLAND; J.L. BLANCO; G. SUAREZ (1990). Overlay technique for direct detection and identification of haemolytic *Listeria* on selective plating medium. Comparison of five media. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 191, 16-19.

DONNELLY, C.W.; G.J. BAIGENT (1986). Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. Appl. Environ. Microbiol. 52, 689.

DOYLE, M.P.; J.L. SCHOENI (1986). Selective-enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biological specimens. Appl. Environ. Microbiol. 51, 1127-1129.

DOYLE, M.P.; K.A. GLASS; J.T. BEERY; G.A. GARCIA; D.J. POLLARD; R.D. SCHULTZ (1987). Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1433.

DURHAM, R.J.; J.A. MATTINGLY; B.T. BUTMAN; B.J. ROBINSON (1990). A monoclonal antibody enzyme immunoassay (ELISA) for the detection of *Listeria* in foods and environmental samples. En "Foodborne listeriosis" (A.J. Miller, J.. Smith and G.A. Somkuti, eds.), 105-109. Elsevier, Amsterdam.

ELISCHEROVA, K., S. STUPALOVA; J. STEPANEK (1977). Some ecological aspects of *Listeria monocytogenes* in meat industry. Resúmenes del VII International Symposium on the Problems of Listeriosis, 183. Varna, Bulgaria.

EL-KEST, S.E.; E.H. MARTH (1991a). Strains and suspending menstrua as factors affecting death and injury of *Listeria monocytogenes* during freezing and frozen storage. J. Dairy Sci. 74 (4), 1209-1213.

EL-KEST, S.E.; E.H. MARTH (1991b). Injury and death of frozen *Listeria monocytogenes* as affected by glycerol and milk components. J. Dairy Sci. 74 (4), 1201-1208.

EL-KEST, S.E.; A.E.YOUSEF; E.H. MARTH (1991). Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing and frozen storage. J. Food Sci. 56, 10.

EMOND, E; I. FLISS; S. PANDIAN (1993). A ribosomal DNA fragment of *Listeria monocytogenes* and its use as a genus-specific probe in an aqueous-phase hybridization assay. Appl. Environ. Microbiol. 59 (8), 2690-2697.

FARBER, J.M. (1989). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. Int. J. Food Microbiol. 8, 285-291.

FARBER, J.M. (1991). *Listeria monocytogenes* in fish products. J. Food Prot. 54, 922-924.

FARBER, J.M.; M.A. JOHNSTON; U. PURVIS; A. LOIT (1987). Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol. 5, 157-163.

FARBER, J.M.; G.W. SANDERS; S. DUNFIELD; R. PRESCOTT (1989). The effect of various acidulans on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 9, 181-183.

FENLON, D.R. (1985). Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. J. Appl. Bacteriol. 59, 537.

FENLON, D.R. (1986). Rapid quantitative assesement of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. Vet. Rec. 118, 240.

FENLON, D.R.; J. WILSON (1989). The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in North-East Scotland. J. Appl. Bacteriol. 66, 191-196.

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; L. DOMINGUEZ; J.A. VAZQUEZ-BOLAND; J.L. BLANCO; G. SUAREZ (1986). *Listeria monocytogenes* dans de lait pasteurisé. Can. J. Microbiol. 32, 149.

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; L. DOMINGUEZ; J.A. VAZQUEZ-BOLAND;

RODRIGUEZ-FERRI, E.F.; BLANCO, J.L.; G. SUAREZ (1987). Survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk treated in a pilot plant size pasteurizer. J. Appl. Bacteriol. 63, 533-537.

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; M.M. BLANCO; J.A. VAZQUEZ-BOLAND; V. BRIONES; J.A. GARCIA; C. DELGADO; M. DOMINGO; J. MARCO; L. DOMNGUEZ (1992a). A direct plating method for monitoring the contamination of *Listeria monocytogenes* in silage. J. Vet. Med. 39, 513-518.

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; C. DELGADO; M.M. BLANCO; J.A. VAZQUEZ-BOLAND; V. BRIONES; G. SUAREZ; L. DOMNGUEZ (1992b). Role of potassium tellurite and brain heart infusion in expression of the hemolytic phenotype of *Listeria* spp. on agar plates. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2251-2256.

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; M.M. BLANCO (1993). Supervivencia y proliferación de *Listeria monocytogenes* en diversos tipos de alimentos. En "*Listeria en alimentos*", 127-134. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

FIEDLER, F.; J. SEGER (1983). The murein types of *Listeria grayi*, *Listeria murrayi*, and *Listeria denitrificans* system. Appl. Microbiol. 4, 444-450.

FLEMING, D.W.; S.L. COCHI; K.L. MaC DONALD; J. BRONDUM; P.S. HAYES; B.D. PLIKAYTIS; M.B. HOLMES; A. ANDUMIER; C.V. BROOME; A.L. REINGOLD (1985). Pasteurised milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. New Eng. J. Med. 312, 404-407.

FOEGEDING, P.M.; A.B. THOMAS; D.H. PILKINGTON; T.R. KLAENHAMMER (1992). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced dry fermented sausage. Appl. Environ. Microbiol. 58, 884-890, 2102.

FRASER, J.A.; W.H. SPERBER (1988). Rapid detection of *Listeria* in food and environmental samples by esculin hydrolysis. J. Food Prot. 51, 762-765.

GEORGE, S.M.; B.M. LUND; T.F. BROCKLEHURST (1988). The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes* Letters Appl. Microbiol. 6, 153-156.

GILBERT, R.J.; S.M. HALL; A.G. TAYLOR (1989). Listeriosis update. PHLS Microbiol. Digest. 6, 33-37.

GITTER, M.; R. BRADLEY; P.H. BLAMPIED (1980). *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. Vet. Rec. 107, 390-393.

GITTER, M.; R. StJ. STEBBINGS; J.A. MORRIS; D. HANNAM; C. HARRIS (1986). Relationship between ovine listeriosis and silage feeding. Vet. Rec. 22, 207-208.

GOLDEN, D.A.; L.R. BEUCHAT; R.E. BRACKETT (1988a). Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. Food Microbiol. 5 (1), 17-23.

GOLDEN, D.A.; L.R. BEUCHAT; R.E. BRACKETT (1988b). Evaluation of selective direct plating media for their to recover uninjured, heat-injured, and freeze-injured *Listeria*

monocytogenes from foods. Appl. Environ. Microbiol. 54 (6), 1451-1456.

GOLSTEYN, E.J.; R.K. KING; J. BURCHAK; V.P.J. GANNON (1991). Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 57 (9), 2576-2580.

GOLSTEYN, E.J.; E.E. TANAKA; R.K. KING; J.Y. KIM; V.P.J. GANNON (1992). Assignment of *Listeria monocytogenes* isolates to two major groups based on PCR amplification and restriction endonuclease digestion of the *iap* gene. Resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis, 184-185. Copenague, Dinamarca.

GOMEZ-MAMPASO, E. (1993). Listeriosis humana: importancia, grupos de riesgo y portadores. En "*Listeria* en alimentos", 141-144. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

GOULET, V; A. LEPOUTRE; J. ROCOURT; A.L. COURTIEU; P. DEHAUMONT; P. VEIT (1993). Epidémie de listeriose en France. Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire. 4, 13-14.

GRAY, M.L. (1960). Isolation of *Listeria monocytogenes* from oat silage. Science. 132, 1767.

GRAY, M.L. (1963). Epidemiological aspects of listeriosis. Am. J. Public Health. 53, 554-563.

GRAY, M.L., H.I. STAFSETH; F.Jr. THORP; L.B. SHOLL, L.B.; W.F.Jr. RILEY (1948). A new technique for isolating *Listerellae* from bovine brain. J. Bacteriol. 55, 471.

GRAY, M.L.; H.J. STAFSETH; F.Jr. THORP (1950). The use of potassium tellurite, sodium azide, and acetic acid in a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 59, 443-444.

GRAY, M.L.; A.H. KILLINGER (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bact. Rev. 30 (2), 309-382.

GRONSTOL, H. (1979). Listeriosis in sheep. Isolation of *Listeria monocytogenes* from grass silage. Acta Vet. Scan. 20, 492.

HAO, D.Y.-Y; L.R. BEUCHAT; R.E. BRACKETT (1987). Comparison of media and methods for detecting and enumerating *Listeria monocytogenes* in refrigerated cabbage. Appl. Environ. Microbiol. 53, 955-957.

HARRIS, L.J.; H.P. FLEMING; T.R. KLAENHAMMER (1991). Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and UAL500 to nisin. J. Food Prot. 54, 836-840.

HARRISON, M.A.; Y.-W. HUANG; C.-H. CHAO; T. SHINEMAN (1991). Fate of *Listeria monocytogenes* on packaged, refrigerated, and frozen seafood. J. Food Prot. 54 (7), 524-527.

HAYES, P.S.; J.C. FEELEY; L.M. GRAVES; G.W. AJELLO; D.W. FLEMING (1986).

Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. Appl. Environ. Microbiol. 51 (2), 438-440.

HEISICK, J.E.; D.E. WAGNER; M.L. NIERMAN<, J.T. PEELER (1989). *Listeria* spp. found on fresh market produce. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1925-1927.

HENRY, B.S. (1933). Dissociation in the genus *Brucella*. J. Infect. Dis. 52, 374-402.

HOLMSTROM, K.; L. ROSSEN; O.F. RASMUSSEN (1992). A novel detection system for *Listeria monocytogenes* based on PCR. Resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis, 29-30. Copenague, Dinamarca.

HUDSON, W.R.; C.G. MEAD (1989). *Listeria* contamination at a poultry processing plant. Letters Appl. Microbiol. 9, 211-214.

ICMSF (1994). Choice of sampling plan and criteria for *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 22, 89-96.

JAMES, S.M.; S.L. FANNIN; B.A. AGREE; B. HALL; E. PARKER; J. VOGT; G. RUN; J. WILLIAMS; L. LIEB; C. SALMINEN; T. PENDERGAST; S.B. WERNER; J. CHIN (1985). Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese-California. Morbi. Mortal. Weekly Rep. 34, 357-359.

JOHNSON, J.L.; M.P. DOYLE; R.G. CASSENS (1990). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products. A review. J. Food Prot. 53, 81-91.

JONES, D. (1992). Current classification of the Genus *Listeria*. Resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis, 7-8. Copenague, Dinamarca.

KAMPELMACHER, E.H.; L.M. VAN NOORLE JANSEN (1961). Listeriose bei mensch und tier in den Niederlander von 1956 bis 1960. Wiener Tieraerztliche Monatsschrift. 48, 442-448.

KAMPELMACHER, E.H.; L.M. VAN NOORLE JANSEN (1969). Isolation of *Listeria monocytogenes* from faeces of clinically healthy humans and animals. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A. 211, 353-359.

KAMPELMACHER, E.H.; L.M. VAN NOORLE JANSEN (1980). Listeriosis in humans and animals in The Netherlands (1958-1977). Zbl. Bakt. Hyg. I. A. 246, 211-227.

KING, W.; S.W. RAPOSA; J.E. WARSHAW; A.R. JOHNSON; D.N. HALBERT; J.D. KLINGER (1989). A new colorimetric nucleic acid hybridization assay for *Listeria* in foods. Int. J. Food Microbiol. 8, 225-232.

KING, W.; S.W. RAPOSA; J.E. WARSHAW; A.R. JOHNSON; D. LANE; J.D. KLINGER; D.N. HALBERT (1990). A colorimetric assay for the detection of *Listeria* using nucleic acid probes. En "Foodborne listeriosis" (A.J. Miller, J.. Smith and G.A. Somkuti, eds.), 117-124. Elsevier, Amsterdam.

KLINGER, J.D.; A.R. JOHNSON (1988). A rapid nucleic acid hybridization assay for *Listeria* in foods. Food Tech. 7, 66-70.

KLINGER, J.D.; A.R. JOHNSON; D. CROAN; P. FLYNN; K. WHIPPIE; M. KIMBALL; J. LAWRIE; M. CURIALE (1988). Comparative studies of nucleic acid hybridization assay for *Listeria* in foods. J. Ass. Off. Anal. Chem. 71 (3), 669-678.

KRAMER, P.A.; D. JONES (1969). Media selective for *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol. 32, 381-394.

LACHICA, R.V. (1990). Same-day identification scheme for colonies of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 56 (4), 1166-1168.

LARSEN, H.E.; H.P.R. SEELIGER (1986). A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. n. Resúmenes del III International Symposium on the Problems of Listeriosis, p. 35. Bilthoven, Holanda.

LEE, W.H.; D. McCLAIN (1986). Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. Appl Environ. Microbiol. 52, 1215-1217.

LEIGHTON, I. (1979). Use of selective agents for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Med. Lab. Sci. 36, 283-288.

LINTON, A.H. (1982). "Microbes, man and animals". John Wiley and Sons, ed. New York, USA.

LOESSNER, M.J.; R.H. BELL; J.M. JAY; L.A. SHELEF (1988). Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* spp. Appl. Environ. Microbiol. 54, 3003-3007.

LOVETT, J.; D.W. FRANCIS; J.M. HUNT; R.G. CRAWFORD (1985). A survey for the incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk. Dairy Food San. Octubre, 399.

LOVETT, J.; D.W. FRANCIS; J.M. HUNT (1987). *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. J. Food Prot. 50 (3), 188-192.

LOVETT, J.; I.V. WESLEY; M.J. VANDERMAATEN; J.G. BRADSHAW; D.W. FRANCIS; R.G. CRAWFORD; C.W. DONNELLY; J.W. MESSER (1990a). High-temperature short-time pasteurization inactivates *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 53 (9), 734-738.

LOVETT, J.; D.W. FRANCIS; J.G. BRADSHAW (1990b). Outgrowth of *Listeria monocytogenes* in foods. En "Foodborne listeriosis" (A.J. Miller, J. Smith and G.A. Somkuti, eds.), 9-12. Elsevier, Amsterdam.

LOVETT, J.; D.W. FRANCIS; J.T. PEELER; R.M. TWEDT (1991). Quantitative comparison of two enrichment methods for isolating *Listeria monocytogenes* from seafoods. J. Food Prot. 54 (1), 7-11.

LOWRY, P.D.; I. TIONG (1988). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat and meats products factors affecting distribution. 34th International Congress of Meat Science and Technology. Brisbane, Australia.

LUND, A.M.; E.A. ZOTTOLA; D.J. PUSCH (1991). Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. J. Food Prot. 54, 602-606.

- MACKEY, B.M.; N. BRATCHELL (1989). The heat resistance of *Listeria monocytogenes* (review). Letters Appl. Microbiol. 9, 89-94.
- MACKEY, B.M.; C. PRITCHET; A. NORRIS; G.C. MEAD (1990). Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. Letters Appl. Microbiol. 10, 251-255.
- MARCO, J.C.; L. GONZALEZ (1993). Epidemiología de la listeriosis animal: importancia, factores de riesgo y portadores. En "*Listeria en alimentos*", 149-155. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
- MARTH, E.H.; E.T. RYSER (1990). Occurrence of *Listeria* in foods: milk and dairy foods. En "Foodborne listeriosis" (A.J. Miller, J.. Smith and G.A. Somkuti, eds.), 151-163. Elsevier, Amsterdam.
- MARTIN, A.; S.E. KATZ (1993). Rapid determination of *Listeria monocytogenes* in foods using a resuscitation/ selection/kit system detection. J. Ass. Off. Anal. Chem. 76 (3), 632-636.
- MARTIN, R.S.; R.K. SUMARAH; M.A. MacDONALD (1984). A synthetic based medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Clin. Invest. Med. 7, 233-237.
- MAVROTHALASSITIS, P. (1977). A method for the rapid isolation of *Listeria monocytogenes* from infected material. J. Appl. Bacteriol. 43, 47-52.
- McBRIDE, M.E.; F. GIRARD (1960). A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. J. Lab. Clin. Med. 55, 153-157.
- McCARTHY, S.A. (1990). *Listeria* in the environment. En "Foodborne listeriosis" (A.J. Miller, J.. Smith and G.A. Somkuti, eds.), 25-29. Elsevier, Amsterdam.
- McCARTHY, S.A. (1991). Pathogenicity of nonstressed, heat-stressed, and resuscitated *Listeria monocytogenes* 1A1 cells. Appl. Environ. Microbiol. 57 (8), 2389-2391.
- McCARTHY, S.A.; M.L. MOTES; R.M. MCPHEARSON (1990). Recovery of heat-stressed *Listeria monocytogenes* from experimentally and naturally contaminated shrimp. J. Food Prot. 53 (1), 22-25.
- McCLAIN, D.; W.H. LEE (1988). Development of USDA-FSIS methos for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. J. Ass. Off. Anal. Chem. 71 (3), 660-664.
- McCLAIN, D.; W.H. LEE (1989). FSIS method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products USDA. FSIS Microbiology Division. Laboratory communication. 57, 2-3.
- McDONALD, R.L.; M.S. BENDECK; M. DATOC-BRYCE (1988). A selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from lactic acid cultured cheese. Los Angeles District Office Release, U.S. Food and Drug Administration. 1521 W. Pico Blvd. Los Angeles, CA 90015, U.S.A.

McLAUCHLIN, J.; P.N. PINI (1989). The rapid demonstration and presumptive identification of *Listeria monocytogenes* in foods using monoclonal antibodies in a direct immunofluorescence test (DIFT). Letters Appl. Microbiol. 8, 25-27.

MENDONCA, A.F.; S.J. KNABEL (1994). A novel strictly anaerobic recovery and enrichment system incorporating lithium for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk containing background microflora. Appl. Environ. Microbiol. 60(11), 4001-4008.

MOREL, A., T. GRAUCHER, J.F. LEMELAND; G.J. STEVENIN; H. BOIRON (1979). Considerations sur l'épidémiologie de la listériose. Ouest Med. 32, 131-134.

MORENO, B. (1993). Presencia de *Listeria* spp. y de *Listeria monocytogenes* en los alimentos: Actuaciones. En "*Listeria* en alimentos", 223-228. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

MORRIS, I.J.; C.D. RIBEIRO (1989). *Listeria monocytogenes* and paté. Lancet ii, 1285-1286.

MOTLAGH, A.M.; S. HOLLA; M.C. JOHNSON; B. RAY; R.A. FIELD (1992). Inhibition of *Listeria* spp. in sterile food systems by pediocin ACh, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilacti*. J. Food Protect. 55 (5), 337-343.

MUNDT, J.O. (1986) Enterococci. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, V.2. (P.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, eds.), p. 1063-1065. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

MURRAY, E.G.D. (1955). A characterization of listeriosis in man and other animals. Can. Med. Assn. J. 72, 99.

NICOLAS, J.A. (1985). Contamination des viandes et des produits de charcuterie par *Listeria monocytogenes* en Haute-Vienne, France. Science des aliments. 5 (Hors serie IV). 175-179.

NIEDERHAUSER, C.; U. CANDRIAN; C. HOFELIN; M. JERMINI; H.-P. BUHLER; J. LUTHY (1992). Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. Appl. Environ. Microbiol. 58 (5), 1564-1568.

NOAH, C.W.; J.C. PEREZ; N.C. RAMOS; C.R. McKEE; M.V. GIPSON (1991). Detection of *Listeria* spp. in naturally contaminated seafoods using four enrichment procedures. J. Food Prot. 54 (3), 174-177.

OLSON, J.C. Jr.; P.M. NOTTINGHAM (1980). Factors affecting life and death of microorganisms. Temperature. En "Microbial ecology of foods" Vol I. ICMSF. Academic Press.

OMS (1986). Report of WHO consultation on prevention and control of listeriosis. Berlín, Alemania. WHO/CDS/VPH/87.69, Ginebra, 1987.

OMS (1988). Foodborne listeriosis, WHO working group. Bulletin of the WHO. 66 (4), 421-428.

ORTEL, S. (1972). Experience with nalidixic acid-trypaflavin agar. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 19, 363-365.

OSCROFT, C.A. (1989). Effects of freezing on the survival of *Listeria monocytogenes*. Technical Memorandum, Campden Food and Drink Research Association. 549.

OSCROFT, C.A.; S.J. ALCOCK; J.A. CLAYDEN (1987). Recovery of sublethally injured bacteria from frozen foods. *Food Microbiol.* 4, 257-268.

PALUMBO, S.A.; A.C. WILLIAMS (1991). Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. *Food Microbiol.* 8 (1), 63-68.

PARISH, M.E.; D.P. HIGGINS (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *J. Food Prot.* 52, 144-147.

PERALES, I. (1993). Listeriosis transmitida por alimentos. Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos. En "*Listeria en alimentos*", 103-115. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

POTEL, J. (1953). The etiology granulomatosis infantiseptica. *Wiss. Zeits.-Martin Luther Univ. Hall Wittenberg III*, 341-364.

PIGRAU, C. (1993). Repercusiones y manifestaciones clínicas de la listeriosis humana en un hospital general. En "*Listeria en alimentos*", 145-148. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

PREVOT, A.R. (1961). *Traite de Systematique Bacterienne*, Vol. 2, 1-771. Dunod, París.

QUEVEDO, F. (1993). *Listeria en alimentos: posición de la OMS y de la ICMSF*. ILE. Enero-febrero, 26-33.

RALOVICH, B.; A. FORRAY; E. MERO; H. MALOVICS; I. SZAZADOS (1971). New selective medium for isolation of *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg. Abt. 1. Orig.* 216, 88-91.

RAY, B. (1979). Methods to detect stressed microorganisms. *J. Food Prot.* 42, 346-355.

RAY, B. (1986). Impact of bacterial injury and repair in Food Microbiology: its past, present and future. *J. Food Prot.* 49, 651-655.

RAY, B. (1989). *Injured index and pathogenic bacteria: occurrence and detection in foods, water and feeds* (B. Ray, ed.). CRC Press, Inc. Boca Ratón, USA.

RAY, B. (1993). Sublethal injury, bacteriocins, and Food Microbiology. *A.S.M. News.* 59 (6), 285-291.

ROCOURT, J.; A. SCHRETTENBRUNNER; R. MALINVERNI; J. BILLE (1986). Meningite purulente aigue à *Listeria seeligeri* chez un adulte immunocompetent. *Schweiz.*

ROCOURT, J.; P.A.D. GRIMONT; H.P.R. SEELIGER (1987a). DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes sensu lato*. Curr. Microbiol. 7, 383-388.

ROCOURT, J.; U. WEHMEYER; E. STAKEBRANDT (1987b). Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus *Jonesia* gen. nov. as *Jonesia denitrificans* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 266-270.

ROCOURT, J.; U. WEHMEYER, P. COSSART; E. STAKEBRANDT (1987c). Proposal to retain *Listeria murrayi* and *Listeria grayi* in the genus *Listeria*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 298-300.

ROCOURT, J.; P. BOERLIN; F. GRIMONT; C. JACKET; J.C. PIFFARETTI (1992). Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42 (1), 171-174.

RORVIK, L.M.; M. YNDESTAD (1991). *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. Int. J. Food Microbiol. 13, 97-104.

ROSENOW, E.M.; H. MARTH (1987). Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole, and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35°C. J. Food Prot. 50 (6), 452-459.

RYSER, E.T.; E.H. MARTH (1991). "Listeria, listeriosis and food safety". Marcel Dekker Inc. New York, USA.

SALUDES, M.M.; J.M. AGUIAR (1994). Evaluación del sistema Vidas-*Listeria* (BioMerieux) para la detección de microorganismos del género *Listeria* en alimentos (1994). 9º Congreso de Microbiología de Alimentos. S.E.M. Lleida, España.

SANABRIA, A. (1993). Puntos de vista de la CE con relación a la listeriosis. En "Listeria en alimentos", 55-57. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

SCHAAK, M.M.; E.H. MARTH (1988a). Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk and yogurt mix during fermentation by thermophilic lactic bacteria. J. Food Prot. 51 (8), 607-614.

SCHAAK, M.M.; E.H. MARTH (1988b). Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. J. Food Prot. 51 (8), 600-606.

SCHLECH, W.F.; P.M. LAVIGNE; R.A. BORTOLUSSI; A.C. ALLEN; E.V. HALDANE; A.W. HIGHTOWER; S.E. JOHNSON; S.H. KING; E.S. NICHOLLS; C.V. BROOME (1983). Epidemic listeriosis. Evidence for transmission by food. New Eng. J. Med. 308, 203.

SCHONBERG, A.; P. TEUFEL; E. WEISE (1989). Serovars of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from food. Acta Microbiol. Hung. 36, 249-253.

SCHUBERT, P.; M. PAWELZIK (1992). Detection of *Listeria* in food by a rapid immunoassay. Resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis,

176-177. Copenague, Dinamarca.

SCHUCHAT, A.; J.D. WENGER; R.W. PINNER; B. SWAMINATHAN, B; C.V. BROOME (1992). Risk factors for listeriosis: Lessons from epidemic and sporadic disease. Resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis, 37-38. Copenague, Dinamarca.

SCHWARTZ, B.; D. HEXTER; C.V. BROOME; A.W. HIGHTOWER; R.B. HIRSCHORN; J.D. PORTER; P.S. HAYES; W.F. BIBB; B. LORBER; D.G. FARIS (1989). Investigation of an outbreak of listeriosis: New hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. J. Infect. Dis. 159 (4).

SEELIGER, H.P.R. (1961). Listeriosis. Hafner Pub. Co., New York, USA.

SEELIGER, H.P.R. (1981). Apathogenic *Listeria*: *L. innocua* sp. n. (Seeliger and Schoop, 1977). Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A. 249, 487-493.

SEELIGER, H.P.R. (1984). Modern taxonomy of the *Listeria* group: relationship to its pathogenicity. Clin. Invest. Med. 7, 217-221.

SEELIGER, H.P.R.; FINGER, H.; KLUTSH, J. (1969). Analytical serology of *Listeria*. En "Analytical serology of microorganisms" Vol. 2 (J.B.G. Kwapinsky, ed.).

SEELIGER, H.P.R.; H.J. WELSHIMER (1974). Genus *Listeria*. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (R.E. Buchanan and N.E. Gibbons, eds.), p. 593-596. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

SEELIGER, H.P.R.; D. JONES (1986). *Listeria*. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, V.2. (P.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, eds.), p. 1235-1245. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

SHERIDAN, J.J.; I. WALLS; J.M. McLAUCHLIN; D. McDOWELL (1991). Use a microcolony technique combined with an indirect immunofluorescence test for the rapid detection of *Listeria* in raw meat. Letters Appl. Microbiol. 13, 140-144.

SHIMIZU, K.; G. OTSUKA; M. OKA (1954). Guanofuracin media for isolation of *Listeria monocytogenes* and its practical application. Japan J. Vet. Res. 2, 1-10.

SIZMUR, K.; C.W. WALKER (1988). *Listeria* in prepacked salads. Lancet i, 1167.

SKOVGAARD, N.; C.A. MORGEN (1988). Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 6, 229-242.

SKALKA, B.; J. SMOLA; K. ELISCHEROVA (1982). Different haemolytic activities of *Listeria monocytogenes* strains determined on erythrocytes of various sources and exploiting the synergism of equi-factor. Zentralbl. Veterinaarmed. Reihe B. 29, 642-649.

SKALKA, B.; J. SMOLA (1983). Selective diagnostic medium for pathogenic *Listeria* spp. J. Clin. Microbiol. 18. (6), 1432-1433.

SKALKA, B.; J. SMOLA; K. ELISCHEROVA (1983). Haemolytic phenomena under

the cultivation of *Listeria innocua*. Zentralbl. Bakteriол. Microbiol. Hyg. Abt. I Orig. Reihe A. 253, 559-565.

SKOVGAARD, N. (1992). *Listeria monocytogenes* in raw food: an overview. Resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis, 133-134. Copenague, Dinamarca.

SMITH, J.L.; D.L. ARCHER (1988). Heat-induced injury in *Listeria monocytogenes*. J. Ind. Microbiol. 3, 105-110.

SORIN, M.L.; O. MARITAZ; A.L. COURTIEU; X. DROUET (1992). *Listeria* immunoenzymatic detection in food: a new test. Resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis, 33-34. Copenague, Dinamarca.

STARBUCK, M.A.B.; P.J. HILL; G.S.A.B. STEWART (1992). Ultra sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction (PCR). Letters Appl. Microbiol. 15, 248-252.

SWAMINATHAN, B.; P.S. HAYES; V.A. PRZYBYSZEWSKI (1988). Evaluation of enrichment and plating media for isolating *Listeria monocytogenes*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 664-668.

TRUSCOTT, R.B.; W.B. McNAB (1988). Comparison of media and procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from ground beef. J. Food Prot. 51 (8), 626-628.

VAN NETTEN, P.; I. PERALES; G.D.W. CURTIS; D.A.A. MOSSEL (1989). Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol. 8, 299-316.

VAN SCHOTHORST, M. (1976). Resuscitation of injured bacteria in foods. En "Inhibition and inactivation of vegetative microbes" (F.A. Skinner and W.B. Hugo, ed.), 317-325. Academic Press.

VARABIOFF, Y. (1990). Incidence and recovery of *Listeria* from chicken with a pre-enrichment technique. J. Food Prot. 53 (7), 555-557, 624.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; L. DOMINGUEZ; M.M. BLANCO; J. ROCOURT; J.F. FERNANDEZ-GARAYZABAL; C.B. GUTIERREZ; R.I. TASCÓN; E.F. RODRIGUEZ-FERRI (1992). Epidemiologic investigation of a silage-associated epizootic of ovine listeric encephalitis, using a new *Listeria*-selective enumeration medium and phage typing. Am. J. Vet. Res. 53 (3), 368-371.

WALKER, R.L.; L.H. JENSEN; H. KINDE; A.V. ALEXANDER; L.S. OWENS (1991). Environmental survey for *Listeria* species in frozen milk product plants in California. J. Food Prot. 54 (3), 178-182.

WANG, R.-F.; W.-W. CAO; M.G. JOHNSON (1992). 16S rRNA-bases probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. Appl. Environ. Microbiol. 58 (9), 2827-2831.

WARBURTON, D.W.; J.M. FARBER; C. POWELL; N.P. TIWARI; S. READ; R.

PLANTE; T. BABIUK; P. LAFFEY; T. KAURI; P. MAYERS; M.J. CHAMPAGNE; T. HUNT; P. LACASSE; K. VIET; R. SMANDO; F. COATES (1992). Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol. 9, 127-145.

WATKINS, J.; K.P. SLEATH (1981). Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. J. Appl. Bacteriol. 50, 1-9.

WEAGANT, S.D.; N. SADO; K.G. COLBURN; J.A. TORKELOSON; F.A. STANLEY; M.H. KRANE; S.C. SHIELDS; C.F. THAYER (1988). The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. J. Food Prot. 51, 655-657.

WEISS, J.; H.P.R. SEELIGER (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 30, 29.

WELSHIMER, H.J. (1981). The genus *Listeria* and related organisms. In "The Prokaryotes". A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria" (Starr y col., eds.) publ. Springer, New York, USA.

WELSHIMER, H.J.; J. DONKER-VOET (1971). *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 21, 516.

WELSHIMER, H.J.; A.L. MEREDITH (1971). *Listeria murrayi* sp. n.: a nitrate reducing, mannitol fermenting *Listeria*. Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 3-7.

WENGER, J.D.; B. SWAMINATHAN; P.S. HAYES; S.S. GREEN; M. PRATT; R.W. PINNER; A. SCHUCHAT; C.V. BROOME, C.V. (1990). *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks: evaluation of a production facility. J. Food Prot. 53, 1015-1019.

WONG, H.C.; W.L. CHAO; LEE, S.J. (1990). Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3101-3104.

YLLA, J. (1993). Contaminación vertical y/o horizontal de la carne y los productos cárnicos. En "*Listeria* en alimentos", 123-125. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

YU, L.S.; D.Y.C. FUNG (1993). Five-tube most-probable-number method using the Fung-Yu tube for enumeration of *Listeria monocytogenes* in restructured meat products during refrigerated storage. Int. J. Food Microbiol. 18 (2), 97-106.

ZIGANGIROVA, N.A.; N.D. KONSTANTINOVA; S.V. PROZOROVSKII; L.N. KATS (1985). Obtaining unbalanced growth forms in *Listeria* and their ultrastructure. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 3, 19-23.